



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LOS CAMBIOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA QUE OCURREN DURANTE EL DESARROLLO JUVENIL EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
CON MENCIÓN INTERNACIONAL

PRESENTADA POR JOSÉ PRIUS MENGUAL
DIRECTOR: Dr. ANTONIO RODRÍGUEZ MORENO

Agradecimientos

En primer lugar, al Prof. Antonio Rodríguez Moreno, quien, con su buen hacer, su paciencia y su confianza, ha hecho posible elaborar esta tesis doctoral.

A mi madre, por creer en mí incluso cuando ni yo mismo creía.

A mi padre, por su apoyo discreto, pero siempre constante.

A mi familia, por estar conmigo en las buenas y en las malas durante este viaje.

A mis amigos, que siempre están ahí para reír o llorar conmigo.

A todos los demás, porque gracias a su forma de ser, me han dado aliento para alcanzar la meta.

Introducción	1
1. El hipocampo	2
1.1 Neuroanatomía del hipocampo	3
1.2 Sinapsis establecida entre los axones de las neuronas piramidales de la región CA3 (colaterales de schaffer) y las dendritas de neuronas piramidales de la región CA1.	4
2. Plasticidad sináptica	5
2.1 Tipos de plasticidad	5
2.1.1 Plasticidad de corta duración	6
2.1.1.1 Aumento de la plasticidad de corta duración: facilitación, aumentación y potenciación	6
2.1.1.2 Disminución de la plasticidad de corta duración: fatiga sináptica, cambios metabotrópicos y desensibilización del receptor	7
2.1.1.3 Facilitación por pares de pulsos	8
2.1.1.4 Depresión por pares de pulsos	8
2.1.2 Plasticidad de larga duración	8
2.1.3 Plasticidad homeostática	10
2.1.3.1 Plasticidad homeostática postsináptica	10
2.1.3.2 Plasticidad homeostática presináptica	10
2.2 Plasticidad sináptica en el hipocampo	10
2.3 Spike timing-dependent plasticity	12
3. Receptores de glutamato	14
3.1 Propiedades moleculares y biofísicas de los receptores de tipo NMDA	15
3.1.1 Familia de subunidades que conforman los receptores de tipo NMDA: GluN1, GluN2, GluN3	15
3.1.1.1 Subunidad GluN1	16
3.1.1.2 Subunidad GluN2 y GluN3	16
3.1.2 Diversidad estructural de los receptores de tipo NMDA	17
3.2 Propiedades biofísicas de los receptores de tipo NMDA	19
3.3 Moduladores endógenos de los receptores de tipo NMDA	20
3.4 Receptores de tipo NMDA presinápticos y plasticidad	21
4. Astrocitos y su relación con la plasticidad	23
4.1 Diversidad de respuesta de los astrocitos a la transmisión sináptica	24
4.2 Efectos sinápticos de los diferentes gliotransmisores	25
4.3 Diversidad de mecanismos que involucran a las células gliales	27
Objetivos	29
Materiales y Métodos	31
1. Animales	32
2. Obtención del tejido	32
3. Registros electrofisiológicos	33
3.1 Diseño experimental	33
3.2 Registros de potenciales postsinápticos excitadores provocados	34
4. Protocolos empleados en los experimentos	36
4.1 Protocolos para inducir la spike timing-dependent plasticity	36
4.2 Protocolo de estimulación por pares de pulsos	37
5. Análisis de datos	37
6. Farmacología	38

Resultados	39
1.Receptorespresinápticosdeglutamato detipoNMDA en elhipocampoderatonesde 13 a 21 días (p13-21)	40
1.1 Existenreceptores detipoNMDA presinapticos tonicamente activos a P13-21 mediando un aumento en la probabilidad de liberación de glutamato en la sinapsis establecida entre axones de neuronas piramidales de la region CA3 y dendritas de neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo.	40
1.2 Los receptores presinápticos de tipo NMDA están compuestos por las subunidades GluN2B/GluN2C/2D	42
1.2.1 El aumento de la liberación de glutamato está mediado por la activación tónica de receptores presinápticos de tipo NMDA que no contienen la subunidad GluN2A	42
1.2.2 Los receptores presinapticos de tipo NMDA que median un aumento de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 contienen la subunidad GluN2B	44
1.2.3 Los receptores presinápticos de tipo NMDA que median un aumento de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 contienen la subunidad(es) GluN2C/2D	46
1.3 La facilitación de la liberación de glutamato mediada por la activación de receptores de tipo NMDA presinápticos requiere de la activación de la proteína quinasa A	48
2. “Spike timing-dependent depression” presináptica en el hipocampo de ratón	53
2.1 El pareamiento repetitivo de actividad presináptica con un potencial de acción postsinaptico a baja frecuencia es suficiente para inducir LTD en hipocampo de ratón a P8-21. esta ltd requiere de receptores de tipo NMDA no postsinápticos para su inducción.	54
2.2 La t-LTD desaparece durante la cuarta semana de desarrollo	57
2.3 Los receptores presinápticos de tipo NMDA están tonicamente activos y facilitan la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 de hipocampo a P13-21 pero no a P22-30	58
2.4 Los transportadores de glutamato no están involucrados en la perdida de la t-LTD	61
3. t-LTP presináptica en ratones de 35 a 42 días postnatales (P35-42)	63
3.1 Papel de los receptores de tipo NMDA en la t-LTP observada a P35-42.	64
3.2 La t-LTP requiere de calcio citoplasmático en la célula postsináptica	66
3.3 La neurona postsináptica produce NO	67
3.4 La inducción de t-LTP requiere de la liberación vesicular de los astrocitos	69
3.5 Los astrocitos son estimulados por el NO liberado por la neurona postsináptica	70
3.6 La t-LTP requiere de la activación de la PKC de los astrocitos	71
Discusión	73
1 Los receptores presinápticos de tipo NMDA tónicamente activos incrementan la liberación evocada y espontánea de glutamato en la sinapsis CA3-CA1	74
2 Composición de los receptores NMDA tónicamente activos implicados en la facilitación de liberación de glutamato	75
3 La actividad de la proteína quinasa A es necesaria para aumentar la liberación de glutamato mediada por la activación de receptores de tipo NMDA	75
4 Receptores presinápticos ionotrópicos de tipo NMDA en el hipocampo	76
5 ¿Cuál es el rol fisiológico de la activación tónica de la liberación de glutamato?	76
6 Pérdida de la t-LTD durante la cuarta semana de desarrollo	77

7 Los receptores presinápticos de tipo NMDA aumentan la liberación espontánea y evocada a P13-21 pero no a P22-30	77
8 ¿Cuál es el rol fisiológico de la pérdida de la t-LTD a P22-30?	77
9 Aparición de una t-LTP a P35-42.	79
10 Papel de los receptores de tipo NMDA en la t-LTP en P35-42.	79
11 La t-LTP requiere la entrada de calcio en la célula postsináptica.	79
12 La neurona postsináptica produce óxido nítrico.	80
13 Se requieren los astrocitos para la inducción de la t-LTP.	80
14 ¿Cuál es el rol fisiológico de esta LTP a P35-42?	81

Conclusiones	83
--------------	----

Referencias Bibliográficas	87
----------------------------	----

Tablas	
--------	--

Tabla 1 Composición de la solución extracelular.	33
Tabla 2 Composición de la solución interna de current-clamp.	34
Tabla 3 Composición de la solución interna de voltaje-clamp.	35

Figuras	
---------	--

Figura 1	Anatomía y situación del hipocampo	3
Figura 2	Dibujo del hipocampo por Ramón y Cajal.	4
Figura 3	Formas de LTP y LTD más estudiadas.	9
Figura 4	Spike timing-dependent plasticity (STDP).	13
Figura 5	Estequiometría de las subunidades y disposición de los receptores NMDA Glu1/2.	18
Figura 6	Señales excitadoras e inhibitoras que afectan al astrocito.	25
Figura 7	Modulación de la sinapsis por efecto de los astrocitos.	26
Figura 8	Esquema del funcionamiento del modelo dnSNARE.	28
Figura 9	Extracción del cerebro.	32
Figura 10	Preparación de rodajas.	33
Figura 11	Microscopio utilizado para la realización de los experimentos.	34
Figura 12	Equipo para el registro electrofisiológico.	35
Figura 13	Ubicación de los electrodos.	36
Figura 14	Diagrama del protocolo utilizado para la inducción de la STDP y curso temporal de los experimentos.	37
Figura 15	Receptores de NMDA presinápticos tónicamente activos en las sinapsis CA3-CA1.	41

Figura 16	Los receptores presinápticos de tipo NMDA son ionotrópicos.	42
Figura 17	Los receptores presinápticos de NMDA que deprimen la pendiente y amplitud de eEPSP en la sinapsis CA3-CA1 no contienen la subunidad GluN2A.	43
Figura 18	El antagonismo de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A no afecta a la frecuencia de los mEPSP.	44
Figura 19	Los receptores presinápticos de NMDA que deprimen la pendiente y amplitud de eEPSP en la sinapsis CA3-CA1 contienen la subunidad GluN2B.	45
Figura 20	El antagonismo de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B disminuye la frecuencia de los mEPSP.	46
Figura 21	El antagonismo de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/2D disminuye la pendiente y amplitud de los eEPSP.	47
Figura 22	El antagonismo de receptores presinápticos de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/2D disminuye la frecuencia de mEPSP.	48
Figura 23	La disminución de la pendiente y amplitud de los eEPSP en la sinapsis CA3-CA1 involucra a la proteína quinasa A.	49
Figura 24	La disminución de la frecuencia de mEPSP en la sinapsis CA3-CA1 involucra a la proteína quinasa A.	50
Figura 25	La facilitación de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 involucra la activación de receptores que contienen la subunidad GluN2B y la posterior activación de PKA.	51
Figura 26	La facilitación de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 involucra la activación de receptores que contienen las subunidad(es) GluN2C/2D y la posterior activación de la PKA.	52
Figura 27	Modelo de t-LTD presináptica en la sinapsis CA3-CA1 de hipocampo de ratón.	54
Figura 28	Esquema de la configuración utilizada en los experimentos.	55
Figura 29	La Spike timing-dependent plasticity (STDP) está presente a P13-21 y requiere de receptores NMDA no postsinápticos.	56
Figura 30	MK-801 añadido de manera extracelular o en el interior de la neurona postsináptica, bloquea completamente las corrientes mediadas por receptores de tipo NMDA.	57
Figura 31	La t-LTD está presente durante las segunda y tercera y desaparece durante la cuarta semana de desarrollo postnatal.	58
Figura 32	Los receptores presinápticos de tipo NMDA están tónicamente activos en la sinapsis CA3-CA1 a P13-21 pero no a P22-30.	59
Figura 33	Actividad miniatura (mEPSP) a P13-21.	60
Figura 34	Actividad miniatura (mEPSP) a P22-30.	60
Figura 35	Los transportadores de glutamato no están involucrados en la pérdida de la t-LTD con la maduración.	62
Figura 36	A P35-42 aparece una nueva forma de spike timing-dependent long-term potentiation (t-LTP) de expresión presináptica.	63

Figura 37	Los receptores de tipo NMDA no participan en la inducción de la t-LTP.	64
Figura 38	Los receptores metabotrópicos de glutamato son necesarios para la inducción de t-LTP.	65
Figura 39	La t-LTP no es afectada cuando se altera el funcionamiento de proteínas G de las neuronas postsinápticas o de los astrocitos.	66
Figura 40	Un aumento de calcio en el interior de la célula postsináptica es necesario para la inducción de t-LTP.	67
Figura 41	El sistema cannabinoide no participa en la inducción de t-LTP.	68
Figura 42	La inducción de t-LTP requiere de óxido nítrico (NO) procedente de la célula postsináptica.	69
Figura 43	La inducción de t-LTP depende de la liberación vesicular de gliotransmisor por parte de los astrocitos.	70
Figura 44	La t-LTP requiere de un aumento en los niveles de NO en los astrocitos.	71
Figura 45	La proteína quinasa C (PKC) del astrocito interviene en la t-LTP.	72
Figura 46	La maduración de P15 a P30 genera cambios en la morfología de las neuronas piramidales de CA1.	78

Abstract (English)

NMDA receptors (NMDARs) are involved in synaptic transmission and synaptic plasticity in different brain regions, and they modulate glutamate release at different synapses. Critical periods of synaptic plasticity facilitate the reordering and refining of neural connections during development, allowing the definitive synaptic circuits responsible for correct adult physiology to be established. At the same time, presynaptic spike timing dependent long-term depression (t-LTD) exists, which depends on the activation of NMDARs and that probably fulfills a role in synaptic refinement. In the hippocampus, this t-LTD is present until the third postnatal week in mice, disappearing during the fourth week of development. In the present doctoral thesis, we studied the developmental profile of t-LTD at CA3-CA1 hippocampal synapses, whether non-postsynaptic NMDARs, putatively presynaptic NMDARs (preNMDARs), are tonically active at CA3-CA1 synapses involved in the loss of t-LTD during the fourth week of development (P22-30). Furthermore, during the fifth week of development (P35-42), spike timing dependent long-term depression observed at P13-21 switch to a spike timing dependent long-term potentiation (t-LTP). We were interested in the cellular and molecular mechanisms underlying this switch related to maturation. We found that at CA3-CA1 synapses, presynaptic NMDA receptors are tonically active between P13 and 21, mediating an increase in glutamate release during this critical period of plasticity. Conversely, at the end of this critical period (P22–P30) and coinciding with the loss of t-LTD, these pre-NMDARs are no longer tonically active. The novel t-LTP found since P35 does not require NMDA receptors but requires an increase of calcium concentration into the postsynaptic neuron cytosol, nitric oxide signaling to astrocytes, PKC activation in the astrocytes, a gliotransmitter/s release and presynaptic metabotropic glutamate receptors. These results show a changing developmental profile in which synaptic plasticity rules vary according to the physiological needs of the brain.

Abstract (Español)

Los receptores de tipo NMDA están involucrados en la transmisión sináptica y en la plasticidad sináptica en diferentes regiones del cerebro y modulan la liberación de glutamato en diferentes sinapsis. Los periodos críticos de plasticidad sináptica facilitan el reordenamiento y refinamiento de las conexiones neuronales durante el desarrollo, permitiendo el establecimiento de los circuitos sinápticos definitivos para la correcta fisiología del cerebro adulto. Al mismo tiempo, existe la *spike timing dependent long-term depression* (t-LTD) en esta sinapsis, que depende de la activación de los receptores de tipo NMDA y que probablemente tiene un rol en el refinamiento sináptico. En el hipocampo, esta t-LTD está presente hasta la tercera semana postnatal del ratón, desapareciendo durante la cuarta semana de desarrollo. En la presente tesis doctoral, se ha estudiado el perfil de desarrollo de t-LTD en la sinapsis hipocampal CA3-CA1, donde receptores de tipo NMDA no postsinápticos, putativamente presinápticos (PreNMDARs) se encuentran tónicamente activos y están involucrados en la pérdida de la t-LTD durante la cuarta semana de desarrollo (P22-30). Además, durante la quinta semana de desarrollo (P35-42), la t-LTD observada a P13-21 cambia a una *spike timing dependent long-term potentiation* (t-TLP). Se ha prestado interés en los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a este cambio durante la maduración. Se ha encontrado que en la sinapsis CA3-CA1, los receptores presinápticos de tipo NMDA están tónicamente activos entre P13 y 21, mediando un incremento en la liberación de glutamato durante este periodo crítico de plasticidad. Por el contrario, al final de este periodo (P22-30) y coincidiendo con la pérdida de la t-LTD, estos PreNMDARs ya no se encuentran tónicamente activos. Esta nueva forma de t-LTP encontrada desde P35 no requiere de receptores de tipo NMDA, pero requiere de un aumento citosólico de calcio en la neurona postsináptica, señalización de óxido nítrico a los astrocitos, activación de la PKC de los astrocitos, liberación de gliotransmisores y receptores metabotrópicos presinápticos de glutamato. Estos resultados muestran un perfil de desarrollo cambiante en el que las reglas de plasticidad sináptica varían según las necesidades fisiológicas del cerebro.

Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico adenosín
AMPc	Monofosfato cíclico
Amy	Amígdala
AP	Potencial de acción
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
bAP	Propagación hacia atrás del potencial de acción
BAPTA	Ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi) etano-n,n',n'-tetraacético
BrSt	Tronco cerebral (brainstem)
CA	Cornu Ammonis
Ca ²⁺	Ion calcio
CaMKII	Complejo calcio calmodulina proteína quinasa II
CB ₁	Receptores cannabinoides de tipo 1
CTD	Dominio C-terminal
Ctx	Corteza cerebral
DAG	Diacilglicerol
D-AP5	Ácido D-2-amino-5-fosofopentanoico
DG	Giro dentado
DMSO	Dimetilsulfóxido
eCB	Endocannabinoide
EEM	Error estándar de la media
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EPSPs	Potenciales postsinápticos excitadores
Fig.	Figura
Glu	Glutamato
hHip	Hipocampo humano
Hz	Hercio
iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato

IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Ion potasio
L	Litro
LTD	Depresión de larga duración
LTP	Potenciación de larga duración
mEPSC	Corrientes postsinápticas excitadoras miniatura
mg	Miligramo
Mg ²⁺	Ion magnesio
mGlu5	Receptor metabotrópico de glutamato de tipo 5
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ms	Milisegundo
mV	Milivoltio
MΩ	Megaohmios
Na ⁺	Ion sodio
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropéptido Y
NTD	Dominio N-terminal
O ₂	Oxígeno
P	Día postnatal
PIP ₂	Inositol difosfato
PKA	Proteína Quinasa A
PKC	Proteína Quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
Post-pre	Protocolo de pareamiento en el cual el potencial de acción postsináptico fue provocado 18 ms antes del inicio del EPSP
PP1	Proteína Fosfatasa 1

PPD	Depresión por pares de pulsos
PPF	Facilitación por pares de pulsos
PPR	Ratio de las respuestas por pares de pulsos
pS	Picosiemens
R	Electrodo de registro
s	Segundo
S	Electrodo de estimulación
SNC	Sistema Nervioso Central
STDP	Spike timing-dependent plasticity
STP	Plasticidad de corta duración
Str	Striatum
t-LTD	Depresión de larga duración dependiente de la coincidencia temporal de la actividad pre y postsináptica
t-LTP	Potenciación de larga duración dependiente de la coincidencia temporal de la actividad pre y postsináptica
THL	Tetrahydrolipstatina
TMD	Dominio transmembrana
VDCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
Zn ²⁺	Ion zinc
Δt	Intervalo temporal
μM	Micromolar
°C	Grado centigrado

I.Introducción

1. EL HIPOCAMPO.

El hipocampo es una región del cerebro que se localiza en el lóbulo temporal bajo la superficie cortical del cerebro. Esta estructura es comparable entre diferentes especies (Johnston y Amaral, 1998) y es una estructura bilateral con dos mitades que son imágenes especulares en ambos hemisferios cerebrales. Está formado por millones de neuronas que se organizan de una forma muy característica. El hipocampo forma parte de la Formación Hipocampal, a la que pertenecen además del hipocampo, el giro dentado, el subículo, presubículo y parasubículo (Andersen et al. 2007).

Gracias a la gran cantidad de estudios realizados en el hipocampo hoy se conoce mucho acerca del desarrollo, sinaptogénesis, neurotransmisores, receptores y canales iónicos asociados de varios tipos de células del hipocampo, siendo las más estudiadas las neuronas piramidales. A lo largo de las arborizaciones dendríticas que se pueden encontrar en las neuronas piramidales que conforman el hipocampo, pueden distinguirse cientos de espinas dendríticas donde residen la mayoría de las sinapsis. De hecho, la eficacia con la que estas sinapsis excitadoras transmiten la información puede variar en función de la actividad neuronal. También se conocen partes del mecanismo que subyace a la activación de estas neuronas en el cerebro. Registros obtenidos de animales vivos en movimiento han demostrado que las células piramidales del hipocampo disparan de manera concreta en determinadas situaciones, como por ejemplo, al explorar un entorno familiar o un entorno novedoso (Andersen et al. 2007). Otra característica interesante del hipocampo es el hecho de que se ha observado que las células granulares del giro dentado se multiplican a lo largo de su vida en distintas especies animales, aunque en humanos es un tema de discusión en la actualidad. Esto hace que el giro dentado sea un área potencialmente importante para estudiar procesos de neurogénesis, así como procesos de reparación neuronal.

El trabajo realizado en hipocampo ha sido importante para conocer el funcionamiento de varios tipos de receptores para diversos aminoácidos excitadores e inhibidores, mecanismos de neurotransmisores, plasticidad sináptica dependiente de actividad y las consecuencias de la excitotoxicidad en el cerebro. Como por ejemplo, en esta estructura se describió por primera vez la potenciación de larga duración (LTP; *long-term potentiation*) (Bliss y Lomo, 1973).

El hipocampo está involucrado en numerosos desórdenes neurológicos como epilepsia, enfermedad de Alzheimer y enfermedades cerebrovasculares. De esta forma, la actividad eléctrica propia de pacientes de epilepsia puede detectarse fácilmente en el hipocampo, así como los primeros cambios patológicos de la enfermedad de Alzheimer se manifiestan inicialmente en la corteza entorrinal (EC, corteza entorrinal) y de aquí los cambios se extienden al hipocampo y finalmente a toda la corteza cerebral.

Es importante destacar que el hipocampo es una estructura muy plástica. Al margen de alteraciones dependientes de actividad de la eficacia sináptica bien conocidas como la LTP, existen numerosos casos de cambios anatómicos en las dimensiones celulares, número y longitud de axones, ramificaciones y conexiones, así como cambios bioquímicos que son resultados de una gran diversidad de posibles estímulos. Por ejemplo, en el hipocampo se ha demostrado el crecimiento axonal (Wang et al. 2011).

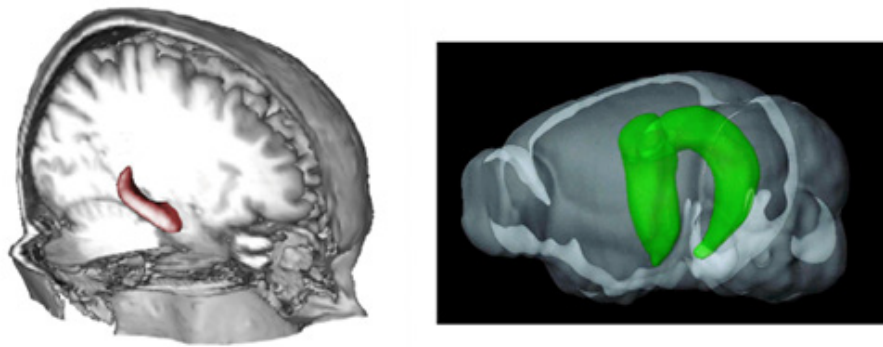


Figura 1: Anatomía y situación del hipocampo en humanos (izquierda) y ratón (derecha).

1.1 Neuroanatomía del hipocampo.

El hipocampo se encuentra organizado de tal forma que algunas de sus células se disponen en capas con disposición laminar. Por ellas se distribuye la información (Andersen et al. 2007). No existe un consenso global acerca de la nomenclatura utilizada para describir las distintas partes que se pueden diferenciar en el hipocampo, pero se suelen admitir tres subdivisiones: CA3, CA2 y CA1 (CA deriva de *Cornu Ammonis*) que se repiten en ratón, rata, mono y hombre de forma similar, aunque con diferencias en cuanto al espesor de las capas celulares o el tamaño y número de subdivisiones.

La entrada de información neocortical alcanza la formación hipocampal a través de la corteza entorrinal. Las células de la capa II proyectan sus axones a las células del giro dentado (DG, *dentate gyrus*) y CA3, constituyendo la principal entrada de información al hipocampo. Los axones que contactan con el giro dentado forman la denominada vía perforante. También, axones de células de la capa III de la corteza entorrinal proyectan a CA1 y subiculum.

La inhibición de la acción excitadora de las diferentes neuronas recae en las interneuronas, cuyo principal neurotransmisor es GABA. Su función es inhibir los procesos llevados a cabo por las neuronas granulares y piramidales para crear un balance excitación/inhibición que permita el correcto funcionamiento cerebral. Las interneuronas están muy extendidas a lo largo de todo el hipocampo y pueden ser clasificadas según su posición laminar, su morfología y las conexiones aferentes que posee. Pueden establecer sinapsis con distintos tipos de neuronas: granulares, piramidales y otras interneuronas. Las conexiones locales entre neuronas piramidales e interneuronas constituyen la principal fuente de inhibición del hipocampo y las conexiones entre diferentes interneuronas GABAérgicas son el principal sustrato para la generación de oscilaciones gamma en el hipocampo.

Las principales células del giro dentado, las células granulares, proyectan sus axones, las fibras musgosas, hacia la región de CA3 conectando con sus neuronas piramidales que a su vez son la fuente de entrada hacia la región CA1. Los axones que proyectan de CA3 a CA1 se denominan colaterales de Schaffer. Las células de la región CA1 proyectan al subiculum y al fórnix proporcionando la mayor salida de información excitadora del hipocampo. A partir de aquí el patrón de conexiones comienza a ser más elaborado de forma que CA1 también proyecta a las capas profundas de la corteza entorrinal, el subiculum proyecta al presubiculum y el parasubiculum. En resumen, el circuito trisináptico excitador del hipocampo está constituido, en este orden, por las sinapsis EC-DG (sinapsis 1), DG-CA3 (sinapsis 2) y CA3-CA1 (sinapsis 3).

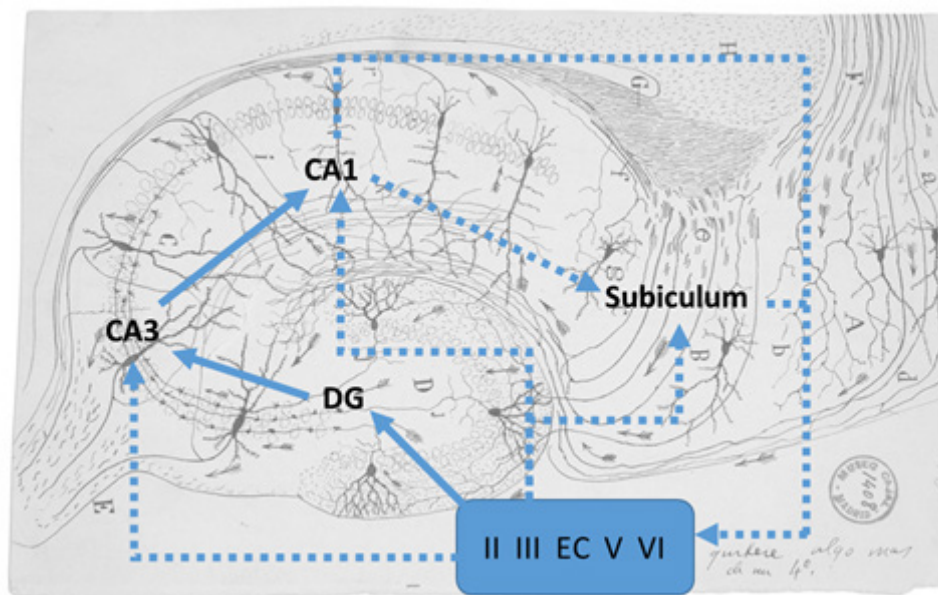


Figura 2: Dibujo del hipocampo por Santiago Ramón y Cajal. Esquema de la formación hipocampal incluyendo las principales conexiones que se dan entre diferentes regiones, entre ellas, el circuito trisináptico. Dibujo realizado por Santiago Ramón y Cajal, Instituto Cajal, Legado Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

1.2 Sinapsis establecida entre los axones de las neuronas piramidales de la región CA3 (co-laterales de Schaffer) y las dendritas de neuronas piramidales de la región CA1.

En el presente trabajo se presentan estudios realizados en la sinapsis establecida entre las neuronas piramidales de la región CA3 y las dendritas de neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo de ratón.

Las proyecciones de CA3 hacia CA1 son la principal entrada de información en las células piramidales de CA1 (Ishizuka et al. 1990). Dichas proyecciones terminan sobre las dendritas basales en el *stratum oriens* y sobre las dendritas apicales en el *stratum radiatum*. Los axones individuales de las neuronas piramidales de CA3 muestran una extensa distribución, innervando neuronas de CA1 en gran parte de la extensión septotemporal del hipocampo (dos tercios de la extensión total).

Las células de la región proximal CA3 del hipocampo, la zona más cercana al giro dentado, son las únicas que muestran las colaterales de Schaffer descritas en la literatura clásica. El espesor característico de estos axones refleja las largas distancias que deben recorrer para innervar una célula distal de CA1. Los axones de las neuronas localizadas en la región distal de CA3 tienden a ser mucho más finos.

Sorprendentemente, la conectividad entre células de las regiones CA3 y CA1 no está clara, pero se estima que es bastante baja. El trabajo de Harris y colaboradores (Sorra y Harris, 2018) indica que quizás solo hay de dos a cuatro contactos entre un único axón y un árbol dendrítico particular y ciertamente, no más de 10 sinapsis entre neuronas típicas de CA3 y CA1. Esta baja conectividad dificulta tremendamente llevar a cabo estudios electrofisiológicos en los cuales se intenten registrar pares de neuronas conectadas de la región CA3 y CA1 conectados para poder determinar los componentes presinápticos involucrados en los mecanismos moleculares de diversos procesos fisiológicos.

2. PLASTICIDAD SINÁPTICA.

La plasticidad neuronal, también conocida como neuroplasticidad, puede ser definida como la habilidad del sistema nervioso para cambiar su actividad y morfología en respuesta a estímulos intrínsecos o extrínsecos reorganizando su estructura, funciones o conexiones. Este fenómeno se encuentra presente en una gran cantidad de procesos fisiológicos (si no en todos) como el desarrollo del cerebro y su homeostasis, el entrenamiento sensorial, memoria y aprendizaje y la recuperación de lesiones cerebrales.

El término “plasticidad sináptica” fue introducido por el histólogo español Santiago Ramón y Cajal, en la Croonian Lecture de la Royal Society en Londres, en 1894, a la que había sido invitado por el Premio Nobel británico Sir Charles Scott Sherrington, para describir los cambios persistentes en la eficacia sináptica, en lo que él llamaba su “teoría de la gimnasia cerebral” sugiriendo que la capacidad del cerebro podía ser aumentada incrementando el número de conexiones. Esta idea era compartida por muchos de sus coetáneos como el científico polaco Jerzy Konorski.

A mediados del siglo XX, el neuropsicólogo canadiense Donald Hebb postuló de forma teórica en su libro “La organización del comportamiento” cuáles podrían ser los mecanismos neuronales que subyacen a diversos procesos cognitivos (Hebb, 1949).

“Cuando un axón de una célula A está lo suficientemente cercano de una célula B como para excitarla y participa repetida o persistentemente en su disparo, ocurre algún proceso de crecimiento o cambio metabólico en una o en ambas células de modo tal que aumenten tanto la eficiencia de A como la capacidad de excitación de la célula B”

Hebb postuló que la coactivación repetida y persistente de las neuronas debería incrementar la fuerza conectiva entre poblaciones de neuronas interconectadas. Las ideas de Hebb inspiraron a muchos neurocientíficos que intentaron demostrar experimentalmente cómo estas modificaciones sinápticas, de existir, podrían ser responsables de los procesos de plasticidad sináptica.

Casi 25 años después apareció la primera descripción de una sinapsis “Hebbiana” en el cerebro de los mamíferos. En 1973, Tim Bliss y Terje Lomo reportaron un aumento de la eficacia sináptica en la sinapsis establecida entre células de la vía perforante y las células granulares del hipocampo que podía ser inducida por una breve estimulación tetánica (Bliss y Lomo, 1973). Unos años antes, el trabajo de Kandel relacionó consistentemente la plasticidad sináptica con el aprendizaje asociativo de reflejo de defensa en *Aplysia* (Kandel y Tauc, 1964). Aunque la relación entre plasticidad sináptica y almacenamiento de la información en el cerebro de mamíferos no está bien establecida aún (Sjöström et al. 2008), la investigación de Kandel sobre el aprendizaje en *Aplysia* es fundamental. En la actualidad, los mecanismos moleculares, biofísicos y celulares que subyacen el aprendizaje comportamental en *Aplysia* se conocen en gran detalle, aunque curiosamente esta plasticidad no es hebbiana (Bailey y Kandel, 2008).

2.1 Tipos de plasticidad.

Hay diferentes formas de plasticidad. Si atendemos a su duración, podemos clasificarlas en plasticidad de corta y de larga duración.

2.1.1 Plasticidad de corta duración.

La plasticidad de corta duración (STP, *short-term plasticity*) proporciona a las sinapsis un poder computacional adicional y tiene importantes implicaciones en la diversidad de señalización en los circuitos neuronales. El rango de acción de la STP abarca desde la potenciación hasta la depresión y su escala temporal varía desde milisegundos hasta minutos. Las diferentes sinapsis de una misma neurona pueden expresar una o varias formas de este tipo de plasticidad de corta duración (Blackman et al. 2013).

La STP surge mayoritariamente de cambios en la liberación de neurotransmisor en diferentes escalas temporales, pero también han sido descrito mecanismos postsinápticos, como la sensibilización del receptor o rutas de señalización metabotrópica. Como la liberación de neurotransmisor depende del patrón de la actividad presináptica, la sinapsis pueden considerarse filtros con propiedades distintivas (Dittman et al, 2000; Fortune y Rose, 2001; Fuhrmann et al, 2002).

2.1.1.1 Aumento de la plasticidad de corta duración: Facilitación, Aumentación y Potenciación.

Con uno o más potenciales de acción presinápticos, la liberación de neurotransmisores puede verse aumentada de varias maneras de forma presináptica ya que existe una correlación directa entre las variaciones de la concentración intracelular de calcio presináptico y la amplitud de los potenciales de acción postsinápticos durante los procesos de facilitación, aumentación y potenciación:

La *facilitación* es un fenómeno en el cual los potenciales de acción postsinápticos aumentan su amplitud cuando dos estímulos se suceden en el terminal presináptico con una diferencia de tan solo unos pocos milisegundos. El aumento de la transmisión sináptica dura del orden de varios cientos de milisegundos. Durante breves trenes de potenciales de acción, los sucesivos potenciales de acción postsinápticos pueden alcanzar una amplitud varias veces mayor respecto al potencial postsináptico inicial. (Zucker, 2002).

La *aumentación* surge durante la fase en la cual la concentración de calcio intracelular decae hasta alcanzar de nuevo el equilibrio y parece estar regulada por dos proteínas transportadoras: la bomba Ca^{2+} ATPasa y proteína intercambiadora transmembrana de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Zucker, 2002). La reducción en el gradiente de Na^+ reduce la capacidad de devolver al espacio extracelular el calcio a través de la proteína intercambiadora $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y esto resulta en un incremento del tiempo que dura el aumento de la concentración residual de calcio durante y después de una estimulación tetánica prolongada. Este proceso dura menos de 30 segundos.

La *potenciación* es un fenómeno de aumento de la transmisión sináptica que surge debido a que cada potencial de acción aumenta la liberación de neurotransmisores sobre en la sinapsis. La presencia de una mayor concentración de calcio intracelular durante periodos más largos de tiempo provoca cambios más persistentes en el tiempo. Estos efectos pueden durar desde los 30 segundos hasta los pocos minutos. A veces los procesos de aumentación pueden ser distinguidos de los fenómenos de potenciación, ya que los efectos de aumentación pueden permanecer bastante menos (entre 5 y 10 segundos) pero en algunas sinapsis los componentes de uno y otro proceso no son fácilmente distinguibles y a veces se les une bajo el término de “post-tetanic potentiation” o PTP (Zucker, 2002).

2.1.1.2 Disminución de la plasticidad de corta duración: Fatiga sináptica, cambios metabotrópicos y desensibilización del receptor.

Existen mecanismos tanto presinápticos como postsinápticos que median una disminución del potencial de acción de corta duración:

La fatiga sináptica, es una forma de plasticidad a corto plazo dependiente de la actividad sináptica que resulta en una incapacidad temporal de las neuronas para generar potenciales de acción. Tiene una causa presináptica, ya que es provocada por un agotamiento de las vesículas sinápticas que contienen los neurotransmisores. Se produce generalmente por una persistente estimulación neuronal de muy alta frecuencia.

La depresión sináptica por activación de receptores metabotrópicos sucede porque muchos terminales presinápticos del Sistema Nervioso Central de los mamíferos tienen receptores metabotrópicos de alta afinidad que pueden ser activados por mensajeros como GABA, glutamato o adenosina. La transmisión sináptica es controlada en parte por estos receptores, que a su vez están controlados por la concentración extracelular de sus agonistas. En algunos casos los niveles de activación tónica son suficientes para activar parcialmente estos receptores, pero si se eleva la concentración de estos neuromoduladores, el efecto puede ser completo sobre la transmisión sináptica. Después de su liberación en la hendidura sináptica, las moléculas pueden actuar de manera homosináptica y unirse a receptores de su propia sinapsis o de manera heterosináptica difundiendo a sinapsis cercanas.

En el caso de la inhibición homosináptica, el contenido vesicular puede actuar sobre el terminal presináptico desde el que se ha liberado. Este fenómeno se llama modulación homosináptica y suele ser de carácter inhibitor. En muchos casos cuando la concentración de neurotransmisor es suficiente para activar los receptores presinápticos, el resultado es una retroalimentación negativa y una reducción de futuras liberaciones de neurotransmisor.

En el caso de la inhibición homosináptica, la activación presináptica puede afectar a sinapsis vecinas. Por ejemplo, la activación de sinapsis excitadoras puede activar a las interneuronas GABAérgicas causando un incremento de la concentración extracelular de GABA. Esto puede activar los receptores GABA_B presinápticos e inhibir la transmisión sináptica a lo largo de varios segundos durante periodos de elevada actividad excitadora.

También es posible que la neurona postsináptica module la liberación de neurotransmisor presináptico. Diferentes tipos de dendritas pueden liberar una variedad de mensajeros que pueden actuar a través de las proteínas G localizadas en el terminal presináptico para influir en la probabilidad de liberación. Neuromoduladores como la dopamina, glutamato, GABA y oxitocina pueden ser liberados desde las dendritas y los cuerpos neuronales. Los mensajeros retrógrados también pueden ser liberados por mecanismos no vesiculares. Los endocannabinoides como 2-AG son producidos por la neurona postsináptica y detectados por el receptor CB₁ de los terminales presinápticos. Por ejemplo, la señalización retrógrada por endocannabinoides endógenos liberados de manera no vesicular se ha visto que suprimen las sinapsis inhibitoras en el hipocampo y tanto las sinapsis inhibitoras como excitadoras en el cerebelo. Ambas formas de liberación son dependientes de calcio y proveen a la neurona postsináptica de un mecanismo para influir en la probabilidad de liberación de sus conexiones sinápticas.

Por último, los fenómenos de desensibilización del receptor son una forma de depresión de corta duración de manera postsináptica. Los canales regulados por ligando son sometidos a

un proceso llamado desensibilización que es análogo a la inactivación de los canales regulados por voltaje. La exposición de los canales regulados por ligando a un agonista provoca la apertura del canal y hace que algunos de esos canales entren en un estado en el que no pueden volver a ser estimulados por un corto periodo de tiempo. Puede tomar desde milisegundos hasta minutos a estos canales el recuperarse de este estado desensibilizado.

2.1.1.3 Facilitación por pares de pulsos.

La facilitación por pares de pulsos (PPF, *paired-pulse facilitation*) consiste en una mayor pendiente o amplitud del segundo potencial postsináptico respecto al primero y se atribuye normalmente a los efectos del incremento del calcio residual en el terminal presináptico, o la unión de calcio a dianas moleculares presinápticas que parecen ser distintas de las que son responsables de la exocitosis rápida, pero que pueden afectar a la probabilidad de liberación (Zucker, 2002).

2.1.1.4 Depresión por pares de pulsos.

La depresión por pares de pulsos (PPD, *paired-pulse depression*) consiste en una menor pendiente o amplitud del segundo potencial postsináptico respecto al primero y se atribuye normalmente al vaciado del conjunto de vesículas preparadas para la liberación (Zucker, 2002).

2.1.2 Plasticidad de larga duración.

Los fenómenos de potenciación (LTP, *long-term potentiation*) y depresión de larga duración (LTD, *long-term depression*) de la transmisión sináptica, que permiten a las neuronas responder a diferentes situaciones internas y externas, son cambios en la fuerza sináptica que perduran en el tiempo y pueden tener un origen presináptico y/o postsináptico. (Turrigiano, 2008).

De forma clásica, se han estudiado tres hipótesis principales sobre la naturaleza de los cambios asociados con la plasticidad, las cuales no son excluyentes entre sí (aunque en la actualidad se conocen otros mecanismos):

- Cambios en la probabilidad de liberación (Malinow y Tsien, 1990).
- Inserción o internalización de receptores de tipo AMPA en la membrana de la neurona postsináptica (Huganir y Nicoll, 2013).
- Fosforilación y de-fosforilación de los receptores de tipo AMPA que dan lugar a cambios en la conductancia (Lee et al. 2000).

Más allá de la importancia relativa de los dos loci de expresión, la plasticidad de larga duración se ha utilizado exitosamente como base teórica para explicar una gran variedad de procesos fisiológicos, como los procesos de cambios sinápticos durante el desarrollo, respuestas a lesiones, respuestas a entrenamiento sensorial y aprendizaje. Por ejemplo, en 2014, Nabavi y colaboradores demuestran *in vivo* que el comportamiento aprendido puede ser inactivado o reactivado mediante protocolos de inducción de LTD y LTP, respectivamente.

Se ha descrito un amplio rango de mecanismos de inducción que dependen del tipo de sinapsis, del paradigma experimental e incluso, en la misma especie, de la edad o temperatura del individuo. Algunos de los mecanismos de inducción más frecuentes dependen de la activación de receptores de glutamato de tipo NMDA que actúan como detectores de coincidencia.

Como ejemplo de esta heterogeneidad, la inducción de plasticidad puede involucrar, además de a las neuronas pre y postsinápticas, a otros participantes celulares como los astrocitos. Uno de los primeros ejemplos de esta plasticidad heterosináptica y de los mecanismos moleculares que subyacen a este tipo de plasticidad se describió en el laboratorio de Eric Kandel en el sistema sensorial de *Aplysia* (Antonov et al. 2003). Desde entonces, la plasticidad heterosináptica se ha observado en muchos modelos sinápticos, en la que se requiere una liberación adicional de neuromoduladores (Chevalayre y Castillo, 2003), transmisión inhibitoria (Ishikawa et al. 2013) o astrocitos aunque el significado fisiológico de este tipo de plasticidad sináptica sigue debatiéndose actualmente.

Además de la plasticidad de corta y larga duración, existen mecanismos que permiten a las sinapsis y a los circuitos neuronales mantener niveles apropiados de excitabilidad y conectividad. Dichos mecanismos se conocen como plasticidad homeostática (Turrigiano, 2008).

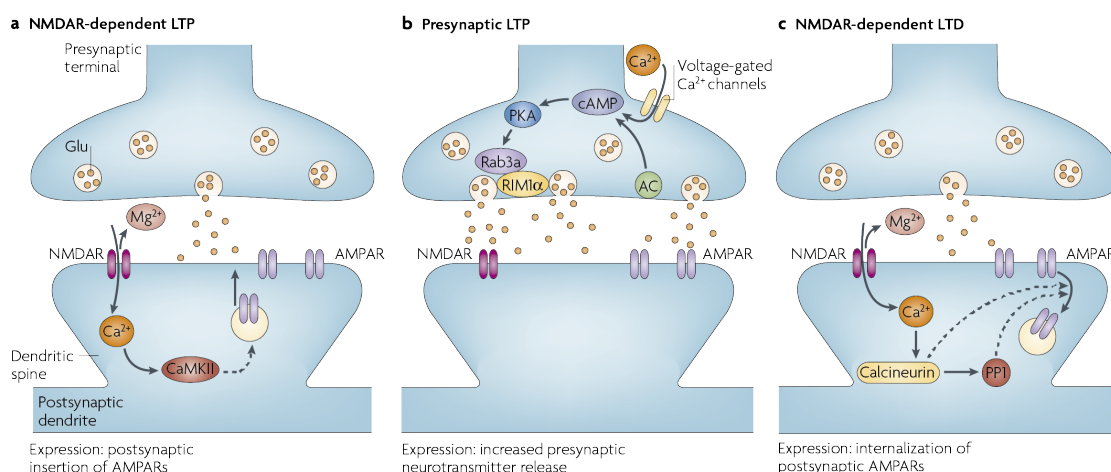


Figura 3: Formas de LTP y LTD más estudiadas. Diagramas simplificados de la inducción y la expresión de distintas formas de plasticidad sináptica observadas en algunas estructuras en el cerebro de roedores. (A) La LTP dependiente de receptores de tipo NMDA postsinápticos se ha observado en muchas regiones diferentes del cerebro. Su inducción depende de la activación de los receptores de tipo NMDA postsinápticos y de la proteína quinasa II dependiente del complejo Calcio/Calmodulina (CaMKII). El cese del bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje de los receptores de tipo NMDA permite a la sinapsis detectar la coincidencia de la liberación presináptica de glutamato y la despolarización postsináptica. La inserción de receptores de tipo AMPA en la membrana postsináptica es el mecanismo principal que subyace a la expresión de la LTP. (B) Se ha caracterizado una forma de LTP presináptica en la sinapsis establecida entre las fibras musgosas y la región CA3 del hipocampo, así como en la sinapsis cerebelar entre las fibras paralelas y las células de Purkinje. La actividad sináptica repetitiva da lugar a una entrada de Ca^{2+} presináptico, el cual activa a la adenilato ciclasa (AC). La activación de la AC produce un aumento de los niveles de AMPc, activando éste a la proteína quinasa A (PKA). Esto a su vez modifica las funciones de Rab3a y RIM1 α permitiendo el incremento de la liberación de glutamato. (C) La LTD dependiente de receptores de tipo NMDA se activa por la entrada de calcio a través de los receptores de tipo NMDA postsinápticos, permitiendo un incremento en la actividad de la proteína fosfatasa Calcineurina y la proteína fosfatasa 1 (PP1). El mecanismo principal de expresión involucra la internalización de receptores de tipo AMPA postsináptico. Tomado de Kauer y Malenka, 2007.

2.1.3 Plasticidad homeostática.

Dada la complejidad de muchos de los circuitos neuronales del sistema nervioso central, mantener la estabilidad sináptica es un problema que se extiende a muchos de los aspectos del desarrollo neuronal y la plasticidad. Por ejemplo, generar un balance de excitación e inhibición que haga que la actividad neuronal pueda propagarse sin acabar desapareciendo o aumentando de manera incontrolable hasta generar un estado epiléptico no es un asunto trivial.

2.1.3.1 Plasticidad homeostática postsináptica.

Un concepto central de la plasticidad homeostática es el escalado sináptico. Este fenómeno fue observado por primera vez en cultivos de neuronas neocorticales (Turrigiano et al. 1998). Es un fenómeno postsináptico de plasticidad homeostática que ocurre por cambios en la cantidad de los receptores de tipo AMPA del terminal postsináptico. Experimentos posteriores (Burrone et al. 2002) apoyaron la noción de que las neuronas corticales e hipocampales piramidales tenían un ratio de disparo objetivo, y que las fuerzas sinápticas se regulan para mantener estos ratios relativamente constantes para poder detectar apropiadamente los estímulos entrantes. El escalado sináptico es fundamentalmente diferente de la LTP o LTD en que no es el resultado de un cambio rápido en la inserción o retiro de receptores AMPA (en unos minutos) sino de un lenta, acumulativa y dinámica forma de plasticidad donde el número de receptores sinápticos de AMPA es continuamente ajustado para estabilizar la probabilidad de disparo de la neurona (Turrigiano, 2008).

2.1.3.2 Plasticidad homeostática presináptica.

La fuerza sináptica es determinada por un número de factores además del número de receptores de la membrana postsináptica. En particular, el número de neurotransmisores presinápticos que se liberan y la probabilidad de que las vesículas cargadas de neurotransmisor se liberen después de un potencial de acción (probabilidad de liberación) son agentes muy importantes en la determinación de la fuerza sináptica. Varios estudios han encontrado que, bajo ciertas condiciones, cambios en los receptores postsinápticos de glutamato y en la probabilidad de liberación pueden cooperar para regular homeostáticamente la transmisión sináptica. Aunque estos procesos pueden ser claramente disociados ya que operan mediante diferentes mecanismos (Burrone et al. 2002; Thiagarajan et al. 2005; Wierenga et al. 2006).

2.2 Plasticidad sináptica en el hipocampo.

Después del descubrimiento de Bliss y Lomo en 1973, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre plasticidad sináptica en el hipocampo. Douglas y Goddard en 1975 mostraron que repetidas ráfagas de estimulación a alta frecuencia eran más efectivas para inducir LTP que un simple tren de estimulación tetánica de mayor duración. Esto indica la importancia de periodos repetidos de estimulación para inducir LTP, como predijo Donald Hebb. En 1977, Gary Lynch y colaboradores descubrieron la LTD en el hipocampo. Encontraron que, mientras que la estimulación tetánica inducía LTP en la ruta activada, en la ruta inactiva se inducía LTD (Lynch et al. 1977). Además encontraron que la LTD homosináptica se inducía cuando se estimulaba la ruta activada con frecuencias más bajas (Dunwiddie y Lynch, 1978).

Tras estos estudios iniciales, el uso de inhibidores farmacológicos y herramientas genéticas han permitido especificar algunas de las moléculas determinantes implicadas en estos procesos de plasticidad.

En la LTP expresada postsinápticamente, está ampliamente aceptado que el flujo de calcio a través de los receptores de tipo NMDA conduce a la activación del complejo Ca^{2+} /quinasa calmodulina (CaMKII) en estas sinapsis (Lisman et al. 2002; Nabavi et al. 2014) aunque en tejidos de animales muy jóvenes, está implicada la activación de la proteína quinasa A (PKA, protein Kinase A)(Yasuda et al. 2003). La activación de estas quinasas desemboca finalmente en un incremento del número de receptores de tipo AMPA y/o su conductancia en el terminal postsináptico, así como en la remodelación de las espinas dendríticas. Se ha descrito que otras proteínas quinasas están involucradas en la LTP, por ejemplo la proteína quinasa C (PKC, protein Kinase C)(Hu et al. 1987; Bliss y Collingridge, 1993).

Las pequeñas GTPasas Ras y Rap pueden ser un puente entre la activación de receptores de tipo NMDA y el reemplazo de los receptores de tipo AMPA. Ras y Rap ejercen sus efectos sobre los receptores de tipo AMPA que contienen diferente composición de subunidades. Por tanto, estas GTPasas, cuya actividad puede controlarse por enzimas postsinápticas actúan como reguladores independientes de la plasticidad en la sinapsis CA3-CA1 (Zhu et al. 2002). Se han descrito otras pequeñas proteínas G, tales como Rac1, Cdc42 y PhoA que juegan un papel esencial como moduladores de la eficacia sináptica durante la LTP dependiente de receptores de tipo NMDA (Qin et al. 2005; Wiens, 2005; Xie et al. 2007).

En estas sinapsis se conocen varias formas de LTD expresadas postsinápticamente. Encontrar un protocolo de inducción capaz de inducir LTD homosináptica expresada postsinápticamente en la sinapsis CA3-CA1 llevó mucho tiempo (Dudek y Bear, 1992). Uno de los protocolos más extendidos para inducir LTD dependiente de receptores de tipo NMDA consistió en estimular a baja frecuencia durante 15 minutos (e.g. 1Hz, 900 pulsos). Si se despolariza levemente la célula piramidal para disminuir el bloqueo por Mg^{2+} de los receptores de tipo NMDA o si se aplican neuromoduladores específicos, el número necesario de repeticiones puede variar (Selig et al. 1995; Kirkwood et al. 1999; Scheiderer et al. 2004). Se ha demostrado que la inhibición de los receptores de tipo NMDA previene la inducción de esta forma de LTD (Dudek y Bear, 1992) y la activación de estos receptores, en ciertas condiciones, la induce (Kandler et al. 1998; Lee et al. 1998; Karmal, 1999). La cascada de señalización que desencadena la activación de receptores de tipo NMDA requiere de señalización por Ca^{2+} dado que la realización de experimentos de inducción de LTD en presencia de BAPTA, un quelante de Ca^{2+} , previno esta forma de plasticidad (Mulkey y Malenka, 1992).

Se ha propuesto un modelo simplificado para la plasticidad sináptica, donde el Ca^{2+} entra a las espinas dendríticas postsinápticas a través de los receptores de tipo NMDA, activando cascadas de señalización que permiten su inducción. Los niveles de Ca^{2+} , así como de la localización específica de la señalización mediada por el mismo, en la célula postsináptica, podría ser elementos claves para determinar la dirección de la plasticidad, dando lugar a la LTP o la LTD.

La diversidad en la composición en subunidades de los receptores NMDA, que se describirán más adelante, es un elemento adicional que confiere una mayor diversidad en las reglas que gobiernan la inducción de la plasticidad sináptica. La diferente composición en subunidades de los receptores les confiere distintas propiedades cinéticas y farmacológicas pudiendo reclutar diferentes moléculas implicadas en cascadas de señalización intracelular (Leonard et al. 1999).

Se ha descrito también una forma de LTD expresada presinápticamente en la sinapsis CA3-CA1. La inducción de esta forma de plasticidad es dependiente de receptores de tipo NMDA presinápticos, donde el óxido nítrico (NO) actúa como mensajero retrógrado (Stanton et

al., 2003; Zhang et al. 2006). Otra forma de plasticidad encontrada en el cerebro, y en particular en CA1, es la LTD mediada por endocannabinoides (eCBs), la cual requiere de la activación de la ruta de señalización cAMP/PKA (Chevalleyre y Castillo, 2003; Heifets y Castillo, 2009). Esta forma de plasticidad es independiente de los receptores de tipo NMDA.

2.3 Spike timing-dependent plasticity.

La *spike timing-dependent plasticity* (STDP) es una regla de aprendizaje probablemente involucrada en el refinamiento de las conexiones sinápticas durante el desarrollo y en procesos de aprendizaje y memoria en adultos (Dan y Poo, 2001; Feldman y Brecht, 2005; Caporale y Dan, 2008). Este mecanismo ha sido estudiado en multitud de organismos, desde insectos hasta humanos, así como en multitud de regiones cerebrales y diferentes tipos neuronales (Caporale y Dan, 2008; Sjöström et al. 2008; Banerjee et al. 2010; Markram et al. 2012).

En 1961, Eccles propuso que el potencial de acción puede propagarse en ambas direcciones. Posteriormente, Levy y Steward en 1983 realizaron un estudio en el cual demostraron que la dirección y la magnitud de los cambios sinápticos dependían del orden temporal de estimulación de dos entradas diferentes (una fuerte y otra débil) desde la corteza entorrinal al giro dentado.

Diez años más tarde, en 1993, Gerstner y colaboradores propusieron que la relación temporal entre espigas individuales pre y post sinápticas contenía más información para la plasticidad que la frecuencia media de disparo, por lo que el preciso instante en el que se genera un potencial de acción (AP, *action potential*) postsináptico debe ser comunicado a la sinapsis (Stuart y Sakmann, 1994).

De hecho, el papel de la propagación ‘hacia atrás’ del AP (bAP, *action potential backpropagation*) en la inducción de plasticidad se describió por primera vez a principios de los años 80 (Baranyi, 1981 (a); Baranyi y Fehér, 1981 (b)). Este descubrimiento se retomó una década más tarde y se redescubrió con la llegada de las técnicas de patch clamp en los 90. En particular, registros duales desde el soma y la dendrita de la misma neurona permitieron demostrar que el AP se propagaba hacia las dendritas (Markram et al. 1995; Stuart y Sakmann, 1994).

Henry Markram, en el laboratorio de Bert Sakmann, se cuestionó como podía influir en la plasticidad sináptica la señal de calcio desencadenada por el bAP y fue el primero en demostrar su implicación en dichos procesos. Registrando pares de neuronas conectadas en la capa 5 de la corteza visual en rodajas de cerebro de rata, encontró que el apareamiento de un AP postsináptico con un EPSP, con un intervalo temporal de 10 ms positivo o negativo, daba lugar a la potenciación o depresión sináptica, respectivamente (Markram et al. 1997). Gracias a este estudio se confirmó por primera vez el papel de la bPA en la plasticidad.

Mientras que la mayoría de los estudios sugerían una correlación de ± 100 ms como requerimiento para la inducción de la plasticidad, algunos estudios notaron el efecto del orden temporal de la actividad pre o postsináptica sobre la misma. La LTP ocurría cuando la actividad presináptica precedía (o era sincrónica) a la actividad postsináptica, mientras que la LTD ocurría cuando la actividad postsináptica precedía a la actividad presináptica (Levy y Steward, 1983; Debanne et al. 1994, 1996).

Gerstner y colaboradores en 1996 ya habían predicho de forma teórica, sin conocer los resultados de Markram (Markram et al. 1997) una forma de plasticidad neuronal dependiente del orden y la coincidencia temporal entre la actividad pre y postsináptica para

explicar la exquisita precisión temporal en la localización del sonido en el sistema auditivo de la lechuza común.

Al mismo tiempo, Magee y Johnston en 1997 realizaron registros dendríticos para demostrar que la LTP se induce más fácilmente cuando se permite la bAP que cuando no se permite, actuando como una señal asociativa. El bAP puede ser el representante de la integración de todas las entradas sinápticas individuales procedentes desde las dendritas (Abbott y Blum, 1996).

Bi y Poo en 1998, caracterizaron detalladamente la dependencia de la ventana temporal para inducir plasticidad en cultivos de células hipocampales. La repentina transición entre LTP y LTD entre los -10 ms y los 10 ms se consideró un hecho sorprendente, sin embargo, hoy en día está considerada como una de las marcas distintivas de la plasticidad dependiente de la coincidencia temporal entre la actividad pre y postsináptica. Abbott y colaboradores bautizaron a esta forma de plasticidad con el nombre de “*spike timing-dependent plasticity*” en el año 2000.

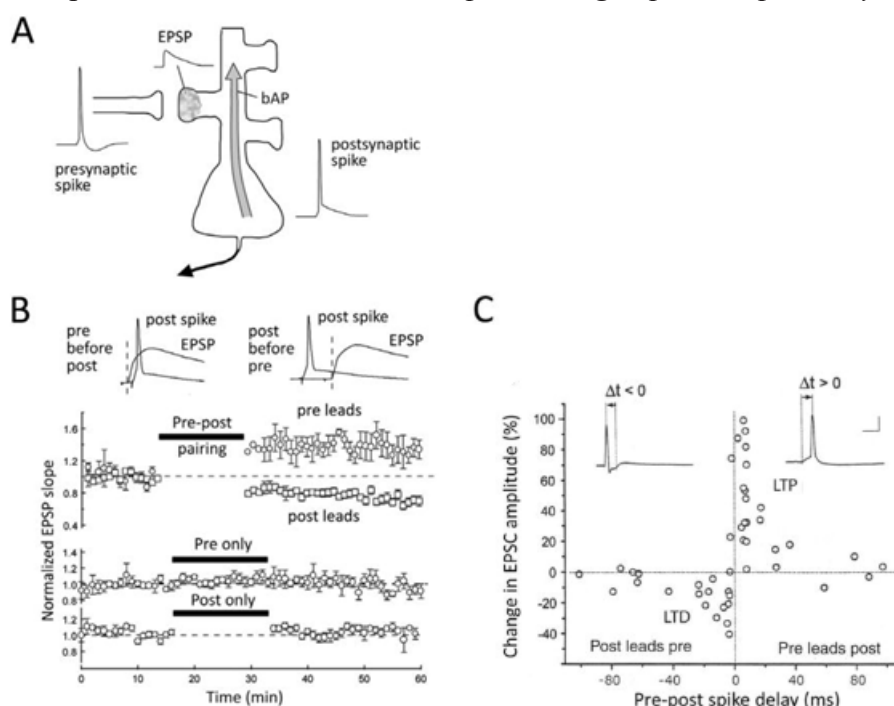


Figura 4: Spike timing-dependent plasticity (STDP). (A) Inducción de la STDP mediante el pareamiento de EPSPs con potenciales de acción postsinápticos. (B) La activación de la actividad presináptica seguida de la activación de la actividad postsináptica produce LTP mientras que la activación de la actividad postsináptica seguida de la activación de la actividad presináptica produce LTD. (C) STDP en cultivos celulares de células hipocampales (Feldman, 2012).

Debanne y colaboradores en 1998 también encontraron que los protocolos de pareamiento inducían STDP en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo, pero observaron una asimetría relevante entre las ventanas temporales capaces de inducir LTD y LTP, siendo mucho más amplia para la inducción de LTD.

Sjöström y colaboradores en 2001, encontraron que también este tipo de desequilibrio para la LTP y la LTD dependientes de la coincidencia temporal entre actividad pre y postsináptica (t-LTP y t-LTD) en la sinapsis neocortical establecida entre neuronas de la capa 5 de corteza visual. En modelos teóricos, se ha mostrado que este tipo de desequilibrio podría ayudar a preservar la estabilidad en plasticidad sináptica (Song et al. 2000; Kempter et al. 2001).

En resumen, la coincidencia temporal entre la actividad presináptica y el disparo postsináptico (Sjöström et al. 2001; Sjöström et al. 2003), el intervalo temporal específico entre la actividad pre y postsináptica (Bi y Poo, 1998), el potencial de membrana postsináptica (Debanne et al. 1994, 1996) y los neuromoduladores (J. Zhang et al. 2009) controlan la eficacia de la transmisión sináptica durante la STDP.

También se han descrito formas de STDP gobernadas por reglas de plasticidad Hebbiana en sinapsis inhibitoras (Haas et al. 2006) así como formas de STDP que no siguen las reglas de plasticidad propuesta por Hebb en muchas regiones del cerebro (Bell et al. 1997; Zhao y Tzounopoulos, 2011).

También se ha descrito una forma de t-LTD dependiente de receptores de tipo NMDA no postsinápticos en la sinapsis establecida entre las neuronas de las capas IV-II/III de corteza somatosensorial (Bender et al. 2006; Nevian y Sakmann, 2006). Estos receptores de tipo NMDA que median una forma de t-LTD presináptica fueron demostrados como presinápticos y axonales (Rodríguez-Moreno and Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al. 2011). Esta forma de t-LTD fue descrita como dependiente de astrocitos (Min y Nevian, 2011). En las mismas sinapsis una nueva forma de LTD, dependiente de frecuencia e independiente de la célula postsináptica también ha sido descrita (Rodríguez-Moreno et al. 2013). Recientemente una forma de t-LTD presináptica ha sido descrita en el hipocampo que depende de la liberación de D-serina por parte de los astrocitos (Andrade-Talavera et al. 2016), esta forma de LTD desaparece con el desarrollo (Andrade-Talavera et al. 2016).

3. RECEPTORES DE GLUTAMATO.

Para comprender las propiedades biofísicas de los receptores activados en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de CA1 durante procesos de plasticidad, es necesario entender las reglas que los gobiernan. Cada protagonista molecular tiene propiedades específicas que traducen los patrones de actividad en rutas de señalización celular, lo que da lugar a diferentes formas de plasticidad. Esta sección se centrará en describir los receptores de glutamato, con especial énfasis en los receptores de glutamato de tipo NMDA, ya que juegan un papel fundamental en la inducción de la STDP.

Glutamato es el neurotransmisor excitador más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos. Este neurotransmisor participa en la transmisión sináptica normal, así como en procesos de plasticidad sináptica, que se consideran correlatos a numerosos procesos celulares (Anwyl, 1999; Kandel y Schwartz, 2000; Citri y Malenka, 2008; Kreitzer y Malenka, 2008; Butz et al, 2009).

La transmisión glutamatérgica también está implicada en procesos de sinaptogénesis y maduración neuronal. Un mal funcionamiento del sistema glutamatérgico puede ser la causa de algunos tipos de epilepsia y contribuir al desarrollo de alteraciones del SNC como isquemia cerebral, hipoglicemia, Alzheimer, Parkinson, Corea de Huntington o Esclerosis Lateral Amiotrófica (Pin y Duvoisin, 1995; Meador-Woodruff y Healy, 2000; Lerma 2001).

Las acciones fisiológicas del glutamato están mediadas por la activación de sus receptores y sistemas de señalización. Los receptores que el glutamato activa se dividen en dos grandes familias: ionotrópicos y metabotrópicos.

a) Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) participan en la neurotransmisión rápida en el sistema nervioso y se clasifican en tres tipos, en función del agonista que los activa con mayor afinidad: receptores de tipo NMDA (ácido N-metil-D-aspartico), de tipo AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores de tipo kainato (Traynelis et al. 2010). Estos receptores forman un canal catiónico con diferente selectividad iónica según el tipo de receptor, siendo permeables a Na^+ , K^+ y en ocasiones a Ca^{2+} . Son proteínas integrales de membrana que están formadas por cuatro subunidades (tetrámeros) iguales (homómeros) o distintas (heterómeros).

b) Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) participan en la neurotransmisión lenta en el SNC. Se dividen en ocho tipos (mGlu 1-8) y están acoplados a proteínas G. Se clasifican en tres grupos de receptores, dependiendo de su función fisiológica y sus vías de señalización:

- Grupo I: Constituido por receptores mGlu1 y mGlu5. Están acoplados de forma positiva a la fosfolipasa C (PLC), la cual promueve la conversión del inositol difosfato (PIP_2) a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). DAG activa una PKC que puede fosforilar receptores ionotrópicos de glutamato. IP_3 tiene numerosos efectos intracelulares, incluyendo la estimulación de la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares.
- Grupo II: Constituido por los receptores mGlu2 y mGlu3. Están acoplados de forma negativa a la formación de AMPc debido a que activan una proteína G que inhibe a la adenilato ciclasa.
- Grupo III: Constituido por los receptores mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8. Están acoplados de forma negativa a la formación de AMPc debido a que activan una proteína G que inhibe a la adenilato ciclasa.

3.1 Propiedades moleculares y biofísicas de los receptores de tipo NMDA.

Los receptores de tipo NMDA tienen características específicas que les confieren unas potentes propiedades computacionales. En apartados anteriores, se describió que los receptores de tipo NMDA median procesos de plasticidad sináptica. Su activación participa en la inducción de cambios de larga duración en la estructura y función sináptica, mecanismos propuestos como las bases celulares de funciones cognitivas superiores (Traynelis et al. 2010).

Los receptores de tipo NMDA presentan una gran diversidad en su composición molecular (subunidades), en sus propiedades biofísicas y farmacológicas, en su interacción con diferentes moduladores alostéricos, así como en su localización subcelular (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Mony y Paoletti, 2011). La composición en subunidades varía a lo largo del sistema nervioso central, durante el desarrollo y en estados patológicos (Mony et al. 2011). Hay también evidencias de que en sinapsis maduras, la composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA cambia dependiendo de la actividad neuronal (Malinow et al. 2002; Matta et al. 2011).

3.1.1 Familia de subunidades que conforman los receptores de tipo NMDA: GluN1, GluN2 y GluN3.

La noción de que existen múltiples subtipos de receptores de tipo NMDA, dotados con propiedades distintivas, emerge durante los primeros estudios utilizando la técnica de patch

clamp sobre preparaciones neuronales. Posteriormente, estudios de clonación revelaron que los receptores de tipo NMDA se ensamblan como tetrámeros que difieren en su composición en subunidades (Traynelis et al. 2010).

Actualmente, se han identificado siete subunidades que se agrupan en tres familias en función de la homología de sus secuencias: la subunidad GluN1, cuatro subunidades GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D) codificadas por 4 genes diferentes y dos subunidades GluN3 (GluN3A y GluN3B), que provienen de dos genes distintos (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004).

Todas las subunidades comparten una arquitectura modular compuesta por cuatro dominios diferentes. El dominio N-terminal (NTD); el dominio de unión del agonista (ABD), al cual se le une glicina o D-Serina (GluN1 y GluN3) y el glutamato (GluN2); el dominio transmembrana (TMD), que contiene el canal iónico; y el dominio C-Terminal (CTD). El NTD y el CTD son las regiones más divergentes (Paoletti et al., 2011). Las principales diferencias entre las distintas subunidades se pueden explicar casi en su totalidad debido a las diferencias en la longitud del dominio C-terminal intracelular (CTD), región que está implicada en el acoplamiento del receptor a cascadas de señalización y en el tráfico intracelular del mismo (Traynelis et al. 2010).

Los receptores de tipo NMDA funcionan como tetrámeros, en los cuales clásicamente se asocian dos subunidades GluN1 con dos subunidades GluN2 o con una mezcla de subunidades GluN2 y GluN3 (Stroebel et al, 2014).

3.1.1.1 Subunidad GluN1.

La subunidad GluN1 es obligatoria en todos los receptores de tipo NMDA y está codificada por un único gen, pero tiene 8 isoformas diferentes, lo cual confiere una mayor heterogeneidad a los receptores de tipo NMDA. Existen 8 variantes de procesamiento alternativo para el ARNm de GluN1 (GluN1-1a -- GluN1-4a y GluN1-1b -- GluN1-4b) que difieren entre sí por la presencia o ausencia de 21 aminoácidos (N1: exón 5) en el dominio N-terminal y por el procesamiento de los diferentes exones 21 y 22, que da lugar a cambios en las secuencias del dominio C terminal (unidades C1, C2 y C2') (Zukin y Bennett, 1995). Las modificaciones del NTD cambian las propiedades farmacológicas (Rumbaugh et al. 2000; Vance et al. 2012) del receptor mientras que las modificaciones en el CTD cambian las propiedades de tráfico y ensamblaje de las subunidades del receptor, así como su acoplamiento a cascadas intracelulares (Horak y Wenthold, 2009). El ARNm de la subunidad GluN1 se expresa de manera generalizada en SNC desde los 14 días de desarrollo embrionario (E14) hasta la edad adulta, coincidiendo con la distribución de receptores de tipo NMDA (Watanabe et al. 1992; Akazawa et al. 1994). No obstante, hay diferencias específicas en la expresión de las isoformas de GluN1: Mientras que GluN1-2 está ampliamente distribuida, GluN1-1 y GluN1-4 muestran distribuciones complementarias, concentrándose GluN1-1 en regiones más rostrales, incluyendo corteza e hipocampo. Los patrones de distribución de la expresión de las isoformas GluN1-1^a y GluN1-1b se solapan, pero su abundancia relativa varía de unas regiones a otras (Laurie y Seeburg, 2018).

3.1.1.2 Subunidades GluN2 y GluN3.

En comparación con la subunidad GluN1, los patrones de expresión, tanto temporal como espacial de las 4 subunidades pertenecientes a la familia GluN2, son diferentes, restringiéndose a ciertos núcleos definidos dentro del SNC, cambiando durante su desarrollo. Estas subunidades son

los principales determinantes en la diversidad funcional del receptor: sensibilidad, conductancia, cinética de desactivación y de de-sensibilización (Vicini et al. 1998; Paoletti et al. 2011), influyendo directamente en la duración de las corrientes postsinápticas excitadoras.

En el cerebro embrionario, solo se expresan las subunidades GluN2B y GluN2D, encontrándose esta última principalmente en regiones caudales. Los principales cambios en el patrón de expresión de subunidades GluN2 ocurren durante las dos primeras semanas postnatales. La expresión de GluN2A comienza poco después del nacimiento y aumenta constantemente hasta llegar a expresarse amplia y abundantemente prácticamente en todas las áreas del SNC adulto. Paralelamente a este aumento progresivo en la expresión de GluN2A, la expresión de GluN2D cae notablemente, y en el adulto solo se expresa a bajos niveles en el diencéfalo y el mesencéfalo. En contraste con la expresión de GluN2D, la expresión de GluN2B se mantiene a altos niveles tras el nacimiento, culminando alrededor de la primera semana postnatal y restringiéndose progresivamente su expresión al prosencéfalo. Por último, la expresión de GluN2C aparece tarde en el desarrollo (P10) y su expresión no está tan extendida como la de otras subunidades.

Las subunidades GluN3A y GluN3B también muestran diferentes perfiles ontogénicos. La expresión de GluN3A culmina a una edad postnatal temprana y posteriormente desciende progresivamente. Contrariamente, la expresión de GluN3B aumenta lentamente a lo largo del desarrollo, y en la edad adulta, se expresa a altos niveles en las neuronas motoras y posiblemente en otras regiones (Henson et al. 2010; Pachernegg et al. 2012).

La expresión específica de subunidades GluN2B, GluN2D y GluN3A en el desarrollo temprano sugiere que estas subunidades son importantes en procesos como la sinaptogénesis, maduración y plasticidad sináptica.

3.1.2 Diversidad estructural de los receptores de tipo NMDA.

De acuerdo con el gran número de subunidades y su expresión conjunta en varias regiones cerebrales, muchos subtipos diferentes de receptores de tipo NMDA coexisten en el SNC. Teniendo en cuenta además las diferentes isoformas de la subunidad GluN1, se han descrito, al menos, una docena de subtipos funcionales diferentes, pero el número exacto puede ser significativamente mayor.

Los receptores de tipo NMDA exhiben propiedades singulares que los distinguen de otros tipos de receptores ionotrópicos dependientes de ligando:

- El canal del receptor de tipo NMDA está sujeto a un bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje.
- El canal del receptor de tipo NMDA es altamente permeable a Ca^{2+} .
- Estos receptores muestran una cinética lenta inusual.
- Su activación requiere de la presencia tanto de glutamato como de un coagonista (glicina o D-serina) (Johnson y Ascher, 1987; Kleckner y Dingledine, 1988; Le Bail et al. 2014).
- Poseen múltiples sitios de unión para pequeñas moléculas que le confieren una gran sensibilidad hacia el microambiente extracelular.

Cada una de estas propiedades varía en función de la composición en subunidades del receptor. Por ello, la composición en subunidades afecta a las propiedades biofísicas y farmacológicas de estos receptores, así como a la ruta de señalización que activará.

Todos los receptores de tipo NMDA contienen dos copias de la subunidad GluN1 obligatoriamente, más dos copias de las subunidades GluN2 y/o GluN3. Se han descrito ejemplos de subtipos de receptores de tipo NMDA con dos isoformas diferentes de GluN1 (Sheng, 1994). Las otras dos subunidades (no GluN1) que componen el receptor pueden ser idénticas o diferentes dando lugar a receptores diheteroméricos o triheteroméricos, respectivamente. Los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2A representan una fracción importante de los receptores de tipo NMDA en juveniles y adultos. Los receptores triheteroméricos GluN1/GluN2A/GluN2B también están presentes en el cerebro adulto, particularmente en el hipocampo y la corteza (desde un 15% a un 50% de la población total de receptores de tipo NMDA) (Al-Hallaq et al. 2007; Gray et al. 2011). Sólo se conocen estimaciones dado que la identificación farmacológica de los receptores triheteroméricos es difícil de establecer. También se han descrito receptores triheteroméricos compuestos por las subunidades GluN1/GluN2A/GluN2C y GluN1/GluN2B/GluN2D (Paoletti et al. 2011). Los receptores diheteroméricos GluN1/GluN3 pueden generar corrientes excitadoras activadas por glicina (Chatterton et al. 2002; Pina-Crespo et al. 2010), pero se cree que in vivo las subunidades GluN3 participan en complejos triheteroméricos GluN1/GluN2/GluN3 (Henson et al. 2010). Por tanto, la incorporación diferencial de las subunidades GluN2 y GluN3 es una fuente principal de diversidad funcional.

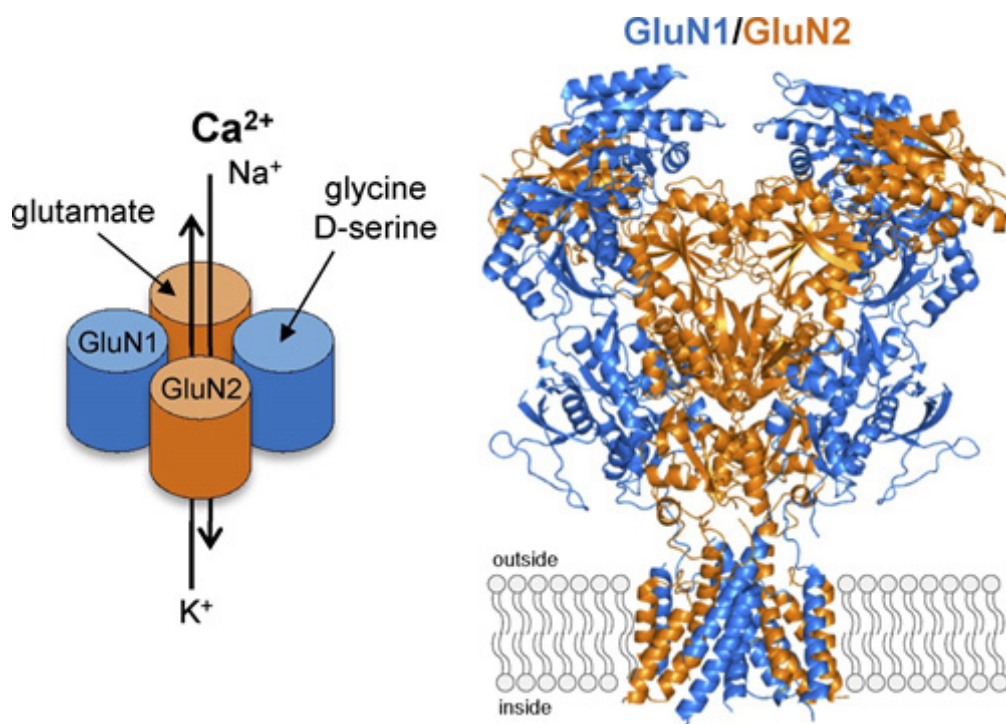


Figura 5: Estequiometría de las subunidades y disposición de los receptores NMDA Glu1/2. La estructura cristalina intacta del receptor muestra que las subunidades GluN1 y GluN2 se ensamblan como heterotetrámeros siguiendo un patrón alterno. El receptor de NMDA está compuesto, por tanto, por dos subunidades con sitios de unión a glicina GluN1 y dos sitios de unión a glutamato GluN2 que forman un canal central permeable a iones. Imagen tomada de Hansen et al. 2018.

. Los diferentes subtipos de receptores de tipo NMDA pueden variar en función de los diferentes tipos neuronales en los que se encuentren (Seeburg et al. 1994) pero incluso pueden coexistir varios subtipos en neuronas individuales (Shinohara et al. 2008; Zhang y Diamond, 2009; Kumar y Huguenard, 2018). También pueden variar en función a su localización subcelular (localización sináptica o extrasináptica) (Gladding y Raymond, 2011; Papouin et al. 2012). Los receptores de tipo NMDA presinápticos con diferente composición en subunidades pueden localizarse en terminales axónicos y modular la eficacia sináptica (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al. 2011; Rodríguez-moreno et al. 2013). Finalmente la heterogeneidad de los subtipos de los receptores de tipo NMDA en el SNC podría verse incrementada aún más por la posible existencia de estos receptores en astrocitos y oligodendrocitos en determinadas condiciones, con una composición en subunidades atípica (conteniendo subunidades GluN3 y GluN2C) (Káradóttir et al. 2005).

3.2 Propiedades biofísicas de los receptores de tipo NMDA.

La conductancia a nivel de canal único, el bloqueo por Mg^{2+} , así como la permeabilidad al Ca^{2+} de los receptores de tipo NMDA están influenciados por la composición en subunidades de los mismos (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Paoletti et al. 2011). Por ejemplo, los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2A o GluN1/GluN2B tienen una conductancia de 50 pS, con una alta sensibilidad al bloqueo de Mg^{2+} y son permeables al Ca^{2+} y, por el contrario, los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2C o GluN1/GluN2D presentan una conductividad (37 pS), una sensibilidad al Mg^{2+} y una permeabilidad al calcio mucho más bajas.

Estas diferencias afectan significativamente a la contribución relativa de los distintos subtipos de receptores de tipo NMDA a la integración sináptica y la plasticidad. En las células granulares del cerebelo, los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C tienen una sensibilidad muy baja al bloqueo por Mg^{2+} . Este bloqueo incompleto permite la señalización durante la estimulación a baja frecuencia incluso a potenciales hiperpolarizados (Schwartz et al. 2012). La incorporación de la subunidad GluN3 tiene como resultado una disminución incluso más dramática de la sensibilidad del receptor al bloqueo por Mg^{2+} (Henson et al. 2010).

La identidad de la subunidad GluN2 también es crucial para determinar las propiedades de apertura del canal, incluyendo la probabilidad máxima de apertura, la sensibilidad al agonista y la cinética de desactivación (Paoletti et al. 2013). Los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2A tienen una mayor probabilidad de apertura que los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2B o GluN1/GluN2C y GluN1/GluN2D. Estos dos últimos subtipos sorprendentemente tienen una baja probabilidad de apertura. De todas formas, los receptores que contienen la subunidad GluN1 y GluN2A tienen la sensibilidad al glutamato y a la glicina. La cinética de desactivación del canal gobierna el tiempo de caída de las corrientes postsinápticas (EPSC, *excitatory postsynaptic current*), el cual también depende de la identidad de la subunidad GluN2. El subtipo GluN1/GluN2A presenta el tiempo de caída más rápido ($T < 30$ ms) (Bidoret et al. 2009) y el subtipo GluN1/GluN2D el más lento (2 s).

Las cinéticas de desactivación del canal están también influenciadas por la isoforma GluN1 que contenga el receptor. Los subtipos de receptores que contienen las isoformas GluN1-b presentan un tiempo de caída más rápido que los que contienen las isoformas GluN1-a cuando se combinan con la subunidad GluN2B (Rumbaugh et al. 2000). Las distintas propiedades de apertura del canal le confieren a cada subtipo de receptor capacidades de transferencia de carga y perfiles de señalización temporal únicos.

La simulación de una respuesta sináptica muestra que: bajo un régimen de estimulación a baja frecuencia, utilizado para inducir la LTD en la sinapsis CA3-CA1, el subtipo de receptores de tipo NMDA GluN1/GluN2B tiene una mayor contribución a la transferencia de carga total que el subtipo GluN1/GluN2A. Por el contrario, bajo una estimulación tetánica de alta frecuencia, típicamente usada para inducir la LTP en la misma sinapsis, la transferencia de carga total mediada por el subtipo GluN1/GluN2A sobrepasa considerablemente a la transferencia mediada por el subtipo GluN1/GluN2B (Erreger et al. 2005).

Otra fuente de heterogeneidad y complejidad es la presencia de receptores tipo NMDA presinápticos (Rodríguez-Moreno y Paulsen. 2008). A pesar de la dificultad para registrarlos directamente, se ha mostrado un papel clave en la plasticidad sináptica en el cerebro (Sjöström et al. 2003; Bender et al. 2006; Rodríguez-Moreno y Paulsen. 2008; Rodríguez-Moreno et al. 2011; Rodríguez-Moreno et al. 2013; Perez-Otaño y Rodríguez-Moreno, 2019). Desafortunadamente, poco se conoce sobre las propiedades de apertura de los receptores triheteroméricos que contienen más de un tipo de subunidades GluN2 o de una subunidad GluN2 y una subunidad GluN3. Dos estudios recientes han intentado responder a esta pregunta. Registrando ovocitos de *Xenopus*, que expresan selectivamente en su superficie receptores de tipo NMDA triheteroméricos, Stroebel y colaboradores en 2014 establecieron que los receptores triheteroméricos GluN1/GluN2A/GluN2B tienen propiedades farmacológicas y de apertura del canal únicas. Ellos revelaron que la subunidad GluN2A tiene un efecto dominante sobre las propiedades del receptor, el fenotipo de GluN2B únicamente es dominante para la sensibilidad por la glicina y la sensibilidad al zinc es intermedia entre ambas isoformas. Por el contrario, Hansen y colaboradores el mismo año concluyeron que el zinc pero no el ifenprodil inhibe a los receptores diheteroméricos y triheteroméricos de igual manera (Hansen et al. 2014).

La caracterización de las distintas combinaciones en la composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA ayudará a comprender la transmisión sináptica y la plasticidad en el cerebro.

3.3 Moduladores endógenos de los receptores de tipo NMDA.

En el SNC se han encontrado numerosas sustancias endógenas, tales como protones, poliaminas y Zn^{2+} que actúan como potentes moduladores de los receptores de tipo NMDA (Paoletti et al. 2011). Las poliaminas están presentes tanto en el medio intracelular como en el medio extracelular. Estas pueden secretarse tras la activación de los receptores de tipo NMDA en condiciones fisiológicas (Fage et al. 1992) o en condiciones patológicas (Paschen et al. 1992). El miembro más estudiado de esta familia es la espermina. La espermina puede estar involucrada, parcialmente, en la disminución de la inhibición tónica debida a protones, observada sobre receptores de tipo NMDA que contienen el exón 5. Esta inhibición alcanza valores de casi el 50% a un pH fisiológico (pH 7,3-7,5).

La sensibilidad a estos moduladores está fuertemente influenciada por la composición en subunidades del receptor. Los protones inhiben preferentemente a los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B o la subunidad GluN2D (Banke, 2005) mientras que las poliaminas extracelulares potencian significativamente a los receptores que contienen la subunidad GluN2B (Mony et al. 2009). Curiosamente esta potenciación se pierde en los receptores que contienen las isoformas GluN1-b (Traynelis et al. 2010).

En contraste, el ion zinc actúa como un antagonista altamente específico de los receptores GluN1/GluN2A. Tanto el NTD de la subunidad GluN2A como el de la subunidad GluN2B

contienen sitios de unión para el Zn^{2+} (Rachline, 2005) pero la diferencia en la afinidad es tal que cuando se aplican concentraciones bajas de Zn^{2+} ($<1 \mu\text{M}$) solo se afectan los receptores que contienen la subunidad GluN2A (Bidoret et al. 2009; Nozaki et al. 2011; Vergnano et al. 2014).

Cada vez existe un número mayor de elementos farmacológicos que pueden discriminar entre los diferentes subtipos de receptores de tipo NMDA. Los compuestos mejor caracterizados son el ifenprodil y sus derivados (tal como Ro 25-6981) los cuales son compuestos sintéticos que actúan selectivamente sobre receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B (Karakas et al. 2011). La sensibilidad opuesta de los receptores que contienen GluN2A y los receptores que contienen GluN2B al Zn^{2+} y al Ro 25-6981 se ha utilizado clásicamente para distinguir entre este tipo de receptores (Papouin et al. 2012) aunque la presencia de receptores triheteroméricos complica la interpretación de los resultados, como vimos anteriormente. De hecho, los receptores GluN1/GluN2A/GluN2B unen tanto Zn^{2+} como ifenprodil con alta afinidad pero la máxima inhibición es débil (20%) (Hatton y Paoletti, 2005). Por tanto, la baja sensibilidad al ifenprodil no necesariamente significa que la subunidad GluN2B esté ausente, pudiendo ser indicativo de un coensamblaje de la misma con otras subunidades.

El modulador endógeno mejor descrito en condiciones fisiológicas es el Zn^{2+} . El grupo de Paoletti y colaboradores han mostrado que el Zn^{2+} es un modulador endógeno de la neurotransmisión excitadora in vitro e in vivo. Recientemente han mostrado que tras trenes cortos de estimulación sináptica, relevante fisiológicamente, aumentan transitoriamente los niveles de Zn^{2+} en la hendidura sináptica e inhiben selectivamente a los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A postsinápticos, produciendo cambios en la integración sináptica (Vergnano et al. 2014).

3.4 Receptores de tipo NMDA presinápticos y plasticidad.

La activación de los receptores de tipo NMDA está implicada en la modulación de la liberación espontánea del neurotransmisor, así como de la liberación provocada por la actividad sináptica y de los efectos de larga duración sobre la transmisión sináptica. Los receptores presinápticos dotan a la sinapsis de nuevas y únicas reglas de plasticidad. Se ha propuesto que estos receptores actúan como autorreceptores en muchas estructuras.

Beretta y Jones, en 1996, reportaron que los receptores de tipo NMDA podrían ser presinápticos en un estudio realizado en la capa 2 de la corteza entorrinal de rata. Ellos encontraron que tras la aplicación de D-AP5, la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (mEPSCs) disminuyó, incluso, cuando los receptores de tipo NMDA postsinápticos estaban bloqueado mediante la inclusión de MK801 (inhibidor de receptores de tipo NMDA) en la célula postsináptica. Posteriormente se encontró que la aplicación al baño de ifenprodil potenciaba los mEPSCs en la sinapsis Capa 2- Capa 5 en la corteza entorrinal (Woodhal et al. 2001).

Cada vez hay más estudios que demuestran la implicación de los receptores de tipo NMDA presinápticos en la plasticidad sináptica en numerosas regiones del cerebro:

- En la sinapsis CA3-CA1 se ha observado facilitación presináptica y LTP expresada de manera presináptica mediada por receptores de tipo NMDA que actúan como autorreceptores, siendo óptima a frecuencias theta, rango que frecuentemente está involucrado en el almacenamiento de la memoria (Larson y Munkacsy, 2015). Recientemente una nueva forma de t-LTD presináptica ha sido descrita en esta sinapsis. Depende de la liberación

de D-serina por parte de los astrocitos (Andrade-Talavera et al. 2016) y desaparece con después de la tercera semana postnatal (Andrade-Talavera et al. 2016).

- También se ha descrito una forma de t-LTD dependiente de receptores de tipo NMDA no postsinápticos en la sinapsis establecida entre las neuronas de las capas IV-II/III de corteza somatosensorial (Bender et al. 2006; Nevian y Sakmann, 2006). Estos receptores de tipo NMDA que median una forma de t-LTD presináptica fueron demostrados como presinápticos y axonales (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al. 2011). Esta forma de t-LTD fue descrita como dependiente de astrocitos (Min y Nevian, 2011). En las mismas sinapsis una nueva forma de LTD, dependiente de frecuencia e independiente de la célula postsináptica también ha sido descrita (Rodríguez-Moreno et al. 2013).
- Los receptores presinápticos de tipo NMDA participan en la inducción en algunas formas de plasticidad sináptica de larga duración en la corteza cerebral. Se ha observado que están involucrados en la inducción de la t-LTD en la sinapsis de Capa2/3-Capa 4 en la corteza somatosensorial de ratón (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008) así como la inducción de la t-LTD en la capa 4 de la corteza visual de animales jóvenes (Sjöström et al. 2001; Larsen et al. 2010; Buchanan et al. 2012). A pesar de que estas formas de plasticidad sináptica son dependientes de este tipo de receptores, la composición en subunidades de los mismos difiere. En algunas ocasiones, los protocolos requeridos para inducir plasticidad están determinados por las propiedades biofísicas de los receptores de tipo NMDA y su composición de subunidades (Rodríguez-Moreno et al. 2011; Rodríguez-Moreno et al. 2013). En particular, la dependencia de la frecuencia de la t-LTD se debe a la necesidad de disminuir el bloqueo de Mg^{2+} mediante despolarización dependiente de actividad. Este puede ser el caso para la dependencia de frecuencia observada en la Capa 4 de la corteza entorrinal (Woodhall et al. 2001; Chamberlain et al. 2008).
- En el cerebelo, la sinapsis establecida entre las fibras paralelas y las células de Purkinje expresan una forma de LTD que es dependiente de la activación de receptores presinápticos de tipo NMDA (Casado et al. 2002). En estas sinapsis, el glutamato se une a este receptor, el cual actúa como un autorreceptor. Durante el tiempo que el glutamato está unido al receptor y promueve su apertura, el Mg^{2+} puede bloquear su permeabilidad. La entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de tipo NMDA solo ocurre si las fibras paralelas disparan de nuevo antes de que se disocie el glutamato del receptor. Esto puede establecer una regla de plasticidad que selecciona altas frecuencias de disparo en el elemento presináptico. De hecho, solo la actividad en trenes de disparo a más de 40 Hz da lugar a la LTD. Esta alta frecuencia puede estar determinada por la alta cinética del desacoplamiento del glutamato que viene dada por la subunidad GluN2A presente en los receptores de tipo NMDA en las fibras paralelas (Bidoret et al. 2009).
- Samson y Paré sugirieron en 2005 que en la amígdala central, la LTP expresada presinápticamente solo ocurre cuando las aferencias corticales tienen una actividad a alta frecuencia, la cual también se requirió en la amígdala lateral (Bissiere et al. 2003). Se ha demostrado que ambas formas de LTP dependen de receptores presinápticos de tipo NMDA y aunque ha sido publicado que el óxido nítrico puede jugar un papel en la inducción de la t-LTP convencional en las entradas talámicas y la adquisición del condicionamiento del miedo (Schafe et al. 2005), el papel del NO sobre la plasticidad sináptica en las entradas corticales se sigue debatiendo hoy en día.

Los receptores de tipo NMDA presinápticos dotan a las redes neuronales de unas propiedades únicas y originales reglas de plasticidad. Estos receptores parecen jugar un papel importante sobre la maduración de las redes neuronales durante el desarrollo temprano del cerebro, pero también pueden estar presentes y modular la transmisión sináptica en algunas sinapsis de tejidos maduros.

4. ASTROCITOS Y SU RELACIÓN CON LA PLASTICIDAD.

El sistema nervioso está formado por dos grandes tipos celulares, neuronas y células gliales. Las células gliales se subdividen en diferentes tipos según su función: oligodendroglia (SNC) y células de Schwann, microglía y astroglia.

Desde las primeras descripciones sobre las bases celulares del sistema nervioso, las neuronas fueron rápidamente reconocidas como los principales elementos celulares involucrados en la transferencia y el procesamiento de la información, posiblemente porque sus prolongaciones celulares se extendían hasta los órganos de los sentidos, músculos y glándulas. Además, se conocía que la electricidad jugaba un papel fundamental en la función del sistema nervioso y el hecho de que las neuronas fueran eléctricamente excitables apoyaba todavía más esta idea. Por supuesto, está bien establecido que la excitabilidad eléctrica neuronal está basada en la expresión de numerosos canales regulados por voltaje y regulados por ligando que permiten generar corrientes y variaciones en el potencial de membrana (Hille, 2001), lo que representa el principal sustrato biofísico que subyace a la transferencia y el proceso de información a nivel celular del sistema nervioso (Araque y Navarrete, 2010).

Por otra parte, las células gliales y en particular los astrocitos, las células gliales más abundantes del sistema nervioso central, se consideró que jugaban un papel de apoyo para las neuronas, probablemente por la falta de conexiones de largo alcance desde sus somas y la falta de conectividad con los órganos sensores y efectores. Además, aunque los astrocitos expresan canales iónicos en su membrana, el nivel de expresión de algunos canales clave es relativamente bajo y por ello se considera que no son eléctricamente excitables (Sontheimer, 1994; Orkand et al. 1996; Verkhratsky y Steinhäuser, 2000; Seifert y Steinhäuser, 2001).

Los astrocitos juegan papeles importantes en el desarrollo y la fisiología normal del SNC, como el apoyo metabólico de las neuronas, la supervivencia neuronal, la sinaptogénesis y la diferenciación neuronal. También son un elemento clave para la regulación de la homeostasis, regulando concentraciones locales de iones y neurotransmisores. Aun así, a los astrocitos se les ha seguido considerando células pasivas que no participan en el procesamiento de la información que circula por el SNC.

Con la llegada de las técnicas de “*calcium imaging*” en la década de 1990, que permitió monitorizar cambios de calcio en el citoplasma celular, se desafió el dogma que sostenía a las neuronas como los únicos participantes activos en la comunicación cerebral demostrando que los astrocitos interactuaban en una forma de excitabilidad basada en las variaciones de calcio intracelular (Cornell-bell et al. 1990; Charles et al. 1991; Dani et al. 1992; Porter y McCarthy, 1996; Pasti et al. 1997). Esta excitabilidad celular puede manifestarse como respuestas fisiológicas a neurotransmisores, neuromoduladores y cambios extracelulares. Diversos estudios han contribuido a afianzar que estos procesos astrocitarios son un fenómeno ubicuo en el sistema nervioso central (Araque et al. 2014; Rusakov et al. 2014; Khakh et al. 2015).

4.1 Diversidad de respuesta de los astrocitos a la transmisión sináptica.

Los astrocitos expresan una gran cantidad de canales, transportadores y receptores que le otorgan un gran número de funciones para la homeostasis y transmisión sináptica. Los astrocitos pueden secretar muchos de los neurotransmisores que pueden ser expresados en las neuronas, lo que hace que no sea sorprendente ver que respondan a una gran cantidad de neurotransmisores diferentes. Muchos de los estudios que usaron células en cultivo o llevaron a cabo ensayos farmacológicos vieron que los astrocitos podían responder a casi todos los neurotransmisores y neuromoduladores conocidos. En ensayos *in vivo* y en rodajas de cerebro, que son preferibles a los cultivos, donde se producen fuertes cambios fenotípicos que pueden cuestionar la validez de estas aseveraciones, se ha visto que efectivamente pueden responder a la mayoría de los neurotransmisores sinápticos.

La mayoría de estas respuestas son vía receptores acoplados a proteínas G que desencadenan diferentes cascadas de señalización intracelular, incluyendo la movilización del calcio desde reservorios intracelulares. Midiendo los niveles de calcio intracelular, se ha visto que los astrocitos responden a glutamato (Porter y McCarthy, 1996; Perea y Araque, 2005; Wang et al. 2006), al ATP (Bowser y Khakh, 2004; Perea y Araque, 2007), a los endocannabinoides (Navarrete y Araque, 2008; Gómez-Gonzalo et al. 2014), a GABA (Kang et al. 1998; Meier et al. 2008; Mariotti et al. 2015; Mederos et al. 2016; Covelo y Araque, 2018; Mariotti et al. 2018) y a acetilcolina (Perea y Araque, 2005; Takata et al. 2011; Chen et al. 2012;) aunque es de destacar que la evidencia aún es escasa para la respuesta de los astrocitos a otros sistemas de neurotransmisión como la dopamina, histamina, serotonina o los opioides (Eriksson et al. 1993; Stiene-Martin et al. 1998; Peters et al. 2011; Agulhon et al. 2013; Jennings et al. 2017) que tienen importantes funciones cerebrales.

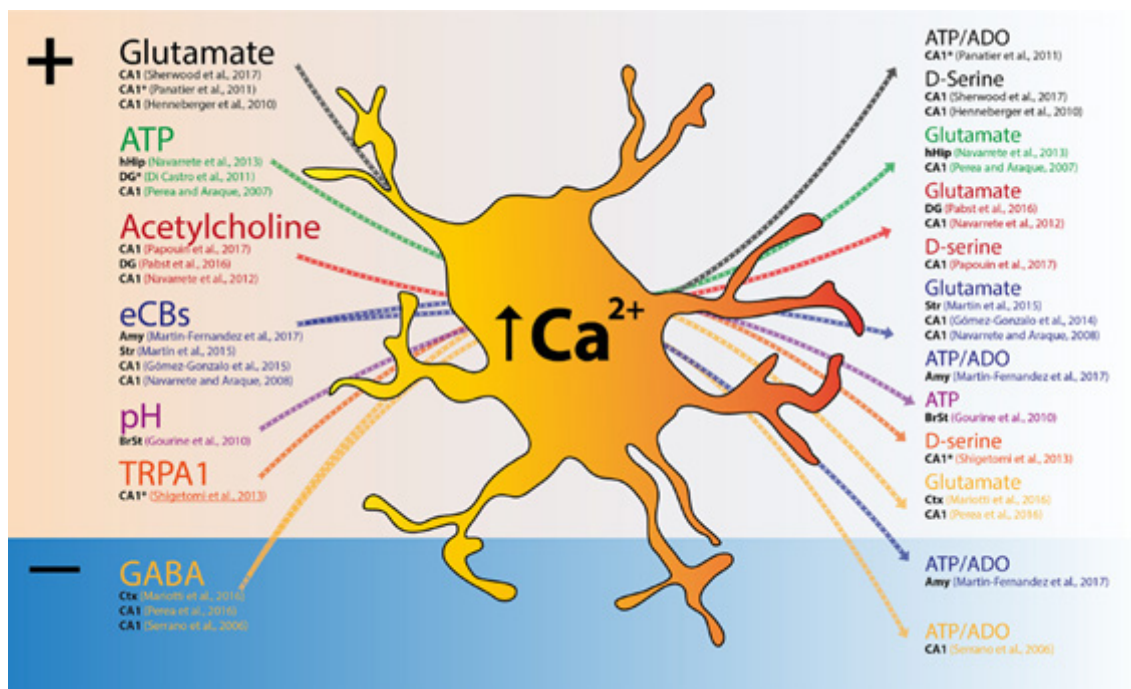


Figura 6: Señales excitadoras e inhibitoras que afectan al astrocito. El esquema muestra las señales que recibe el astrocito y el gliotransmisor que libera. Ambas señales excitadoras e inhibitoras provocan la elevación local o global del calcio intracelular y esto provoca la excitación o inhibición de las sinapsis circundantes. Por cada referencia, la región estudiada es indicada en negro (Amy, Amígdala; BrSt, Brainstem; CA1, región del hipocampo; Ctx, cortex; DG, Giro dentado; hHip, hipocampo humano; Str, Striatum). * Indica que el estudio describe aumentos locales de calcio, más que aumento global. Imagen tomada de Guerra-Gomes et al. 2018.

Una propiedad fundamental de las neuronas es su habilidad para integrar múltiples estímulos sinápticos y hay evidencia de que los astrocitos pueden integrar esta información sináptica entrante a través de su dinámica del calcio (Perea y Araque, 2005; Shigetomi et al. 2008). Por ejemplo, en astrocitos hipocampales la activación simultánea de respuestas colinérgicas y glutamatérgicas que activan receptores metabotrópicos de glutamato y muscarínicos, evocan un menor incremento del calcio que el que se puede dar cuando se activa cualquiera de las dos vías por separado. Un estudio más reciente (Mariotti et al. 2018), ha examinado la señalización GABAérgica en los astrocitos y ha encontrado que la respuesta a los neurotransmisores es plástica y específica del tipo celular. Mariotti y colaboradores estimularon las interneuronas PV, (*parvalbumin*) y las SST, (*somatostatin-positive*) del neocortex in vivo y observaron una diferencias en la respuesta de calcio cuando se estimulaba cada tipo neuronal de manera individual. Mientras que la estimulación repetida de las SST resultaba en una potenciación de las respuestas de calcio, la estimulación repetida de las PV resultaba en una disminución de la respuesta. Esta especificidad era dependiente de la co-activación de los receptores GABA_B y del neuropéptido SST en el astrocito.

4.2 Efectos sinápticos de los diferentes gliotransmisores.

Numerosos estudios han encontrado que los astrocitos pueden liberar una gran variedad de moléculas de señalización, como glutamato, D-serina, ATP/adenosina y GABA. El efecto de cada gliotransmisor en la comunicación sináptica depende del ambiente neuronal específico. La liberación de un gliotransmisor, por ejemplo glutamato, puede tener efectos inhibidores

(Andersson et al. 2007) o excitadores (Jourdain et al. 2007; Martín et al. 2015; Santello et al. 2011) tanto a corto como a largo plazo. La diversidad en el efecto reside en la localización del sitio de unión del gliotransmisor y más específicamente el tipo de receptor al que se une. Por ejemplo la liberación de glutamato fortalece la respuesta glutamatergica sináptica en el hipocampo por una vía independiente de mecanismos que impliquen a los receptores de tipo NMDA (Araque et al. 1998; Jourdain et al. 2007). La liberación de glutamato del astrocito puede actuar en los receptores postsinápticos de tipo NMDA para aumentar la excitabilidad neuronal. Por último, también el glutamato proveniente del astrocito se ha visto que se une a los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo II y III para mediar una depresión heterosináptica (Andersson et al. 2007). Por todo ello, el efecto del glutamato, en este caso, dependerá del perfil específico de receptores pre y postsinápticos que componen la sinapsis tripartita (neurona presináptica, astrocito, neurona postsináptica).

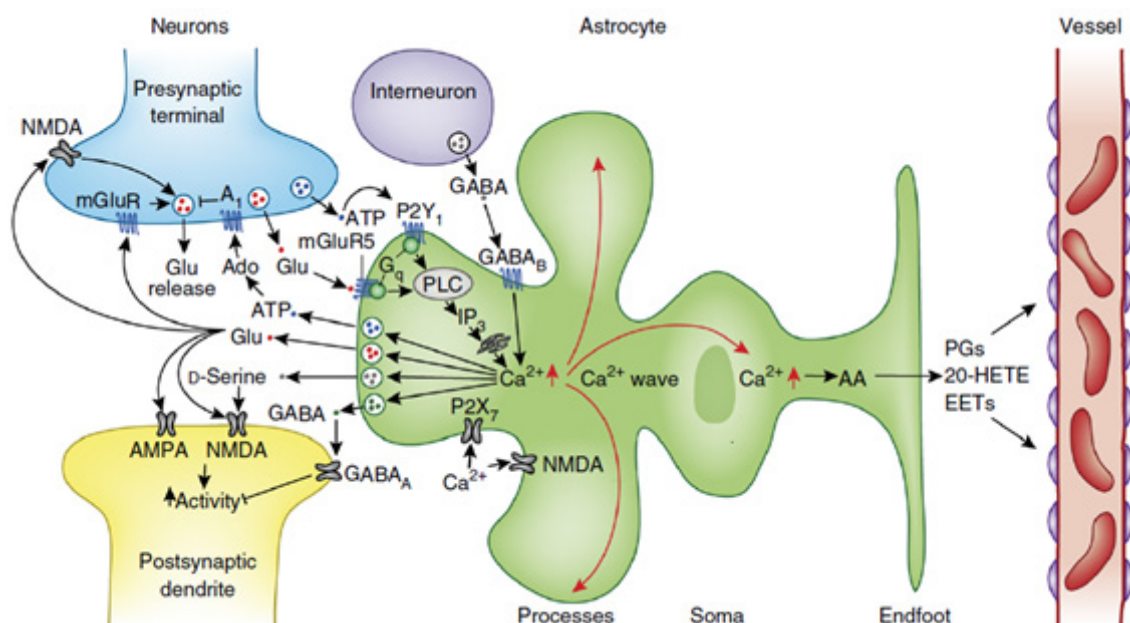


Figura 7: Modulación de la sinapsis por efecto de los astrocitos. Las elevaciones de la concentración intracelular de calcio provocan la liberación de una gran variedad de gliotransmisores que van a modular la actividad neuronal postsináptica pero también pueden actuar sobre el terminal presináptico. Las ondas de calcio pueden extenderse a lo largo de las prolongaciones del astrocito desde el soma hasta sus pies vasculares, donde pueden actuar como vasoreguladores. La morfología de los astrocitos ha sido modificada para poder mostrar las diferentes localizaciones donde ocurren los distintos procesos de señalización. Imagen tomada de Bazargani y Attwell, 2016.

La diversidad de circuitos sinápticos añade más diversidad a la señalización astrocito-neurona. Las consecuencias funcionales de esta especificidad astrocito-neurona sugieren que los astrocitos pueden jugar un papel muy importante en la coordinación de diferentes circuitos neuronales. Sin embargo, una pregunta importante es si un mismo astrocito puede liberar diferentes gliotransmisores y cuáles son las circunstancias que gobiernan este fenómeno. Recientemente se ha comenzado a estudiar los efectos de diferentes formas de estimulación neuronal sobre astrocitos aislados y las cascadas de señalización que se producen en una sola sinapsis glutamatergica en el hipocampo. Araque y colaboradores, en 2018, han encontrado que bajos niveles de estimulación de interneuronas GABAérgicas activan a los astrocitos a través de receptores de tipo GABA_B que resultan en un incremento de la eficacia

sináptica mediada por la liberación de glutamato de los astrocitos y la activación de receptores presinápticos de tipo 1 de los receptores metabotrópicos de glutamato. Por el contrario, mayores niveles de estimulación resultaban en una respuesta bifásica: un aumento inicial y una depresión de larga duración en la eficacia sináptica, que depende de mGluR1 y receptores de adenosina de tipo 1 activados por glutamato y ATP/adenosina, respectivamente, liberados desde el astrocito (Covelo y Araque, 2018). Estos resultados sugieren que un astrocito puede decodificar la entrada de información neuronal e integrar esta información en forma de liberación específica de gliotransmisores que pueden tener un efecto excitador o inhibitorio en la transmisión sináptica y que, de hecho, sí puede liberar diferentes moléculas en diferentes momentos y situaciones concretas.

4.3 Diversidad de los mecanismos que involucran a las células gliales.

Un aspecto importante de la activación del astrocito por diferentes neurotransmisores es que no todos pueden inducir con la misma eficacia la liberación de gliotransmisores. Shigetomi y colaboradores en 2008 mostraron que la activación de dos receptores diferentes en astrocitos hipocámpales elevaba de manera similar los niveles de calcio, pero solo uno de ellos resultaba en liberación de gliotransmisores. Esto lo hicieron midiendo el número de *slow inward currents* (SICs) detectadas en las neuronas cercanas ya que es un fenómeno que se conoce está mediado por la activación de NMDAR neuronales por la liberación de glutamato proveniente de los astrocitos (Araque et al. 1998; Fellin et al. 2004; Perea y Araque, 2005).

Los mecanismos celulares y moleculares responsables de la liberación de gliotransmisores han sido largamente debatidos, y muchos mecanismos, probablemente no excluyentes entre sí, han sido postulados (Araque et al. 2014; Rusakov et al. 2014; Shigetomi et al. 2016). Uno de los mecanismos generales usados para células eucariotas, desde levaduras hasta neuronas de mamíferos, encargado de liberar al espacio extracelular sustancias de manera regulada es el que depende de las proteínas SNARE. Un gran número de estudios ha mostrado que la liberación glial tiene un mecanismo que es calcio y proteína-SNARE dependiente (Araque et al. 2000; Bezzi et al. 2004; Perea y Araque. 2005; Bohmbach et al. 2018).

Schwarz y colaboradores, en 2017, han mostrado que, aunque los astrocitos compartan un proceso dependiente de proteínas SNARE común, hay diversidad en los mecanismos de liberación. Han observado que hay dos vías de liberación SNARE dependientes en el astrocito. Los astrocitos expresaban synaptobrevina II (sybII) en vesículas que contenían glutamato o celubrevina (ceb) en vesículas que contenían neuropéptido Y (NPY), que también contenían ATP. La estimulación de astrocitos con glutamato indujo la exocitosis de las vesículas NPY, y esto depende de la activación de mGlu5 y de la activación y expresión de ceb. La pérdida de la expresión de ceb incrementó la amplitud del evocado en los EPSCs. Por el contrario, cuando se estimulaban los astrocitos con DHPG (agonista de mGlu1) se indujo la liberación de las vesículas que son dependientes de la expresión de sybII. La pérdida de la expresión de sybII tuvo como efecto disminuir la frecuencia de los mEPSCs. Cuando no se expresa ninguno de ambos, la señalización sináptica es comparable al control, lo que sugiere que ambas formas de gliotransmisión tienen efectos opuestos en la transmisión glutamatérgica (Schwarz et al. 2017).

Por último, el mutante transgénico dominante-negativo para el dominio vesicular de la proteína SNARE (dnSNARE) ha contribuido al rápido avance en el campo de la señalización de la neuroglia (Pascual et al. 2005). Fue diseñado para evitar la liberación vesicular en astrocitos gracias a la expresión de la porción vesicular SNARE de la proteína VAMP2/synaptobrevin2 (Zhang et al. 2004).

La generación del complejo SNARE inhibe la unión de las vesículas a la membrana plasmática. Se puede tener una regulación reversible e inducible gracias al sistema “Tet-off” donde el tratamiento con doxiciclina interrumpe la expresión del gen. La selectividad en los astrocitos se obtiene por la expresión transgénica del promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Brenner et al. 1994).

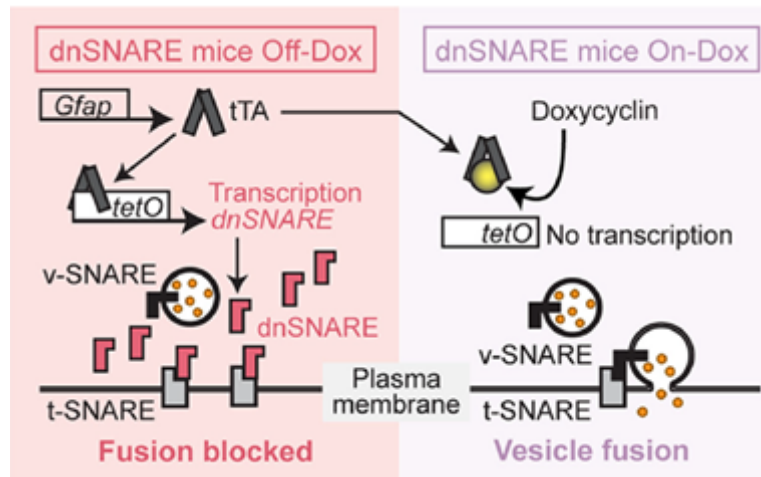


Figura 8: Esquema del funcionamiento del modelo dnSNARE. El tratamiento con doxiciclina interrumpe la expresión del fragmento SNARE, permitiendo una regulación reversible de la liberación vesicular de los astrocitos. Imagen tomada de Fujita et al. 2014.

II.Objetivos

1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los cambios plásticos y los mecanismos celulares y moleculares responsables de los mismos que ocurren durante el desarrollo postnatal en la sinapsis CA3-CA1 en el hipocampo de ratón.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la existencia de receptores presinápticos de tipo NMDA en la sinapsis CA3-CA1 a P13-21 en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1.
- Determinar la composición de subunidades de los receptores presinápticos de tipo NMDA en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1.
- Determinar el mecanismo que media un aumento de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1.
- Determinar el mecanismo celular y molecular que media la inducción y expresión de t-LTD a P13-21 en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1.
- Determinar los mecanismos que median la pérdida de la t-LTD a P22-30 en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1.
- Determinar los mecanismos que median la aparición de la t-LTP a P35.42 en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1.

III. Materiales y métodos

1. ANIMALES.

Los experimentos descritos en la presente memoria se han llevado a cabo en rodajas obtenidas del cerebro de ratones C57Bl/6 de edades comprendidas entre 8 y 45 días postnatales (P8-45, tomando como P0 el día de nacimiento), Fig. 9.A. Todos los procedimientos se realizaron cumpliendo la directiva de la Unión Europea (609/86/EU) para el uso de animales de laboratorio en experimentos agudos y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Pablo de Olavide.

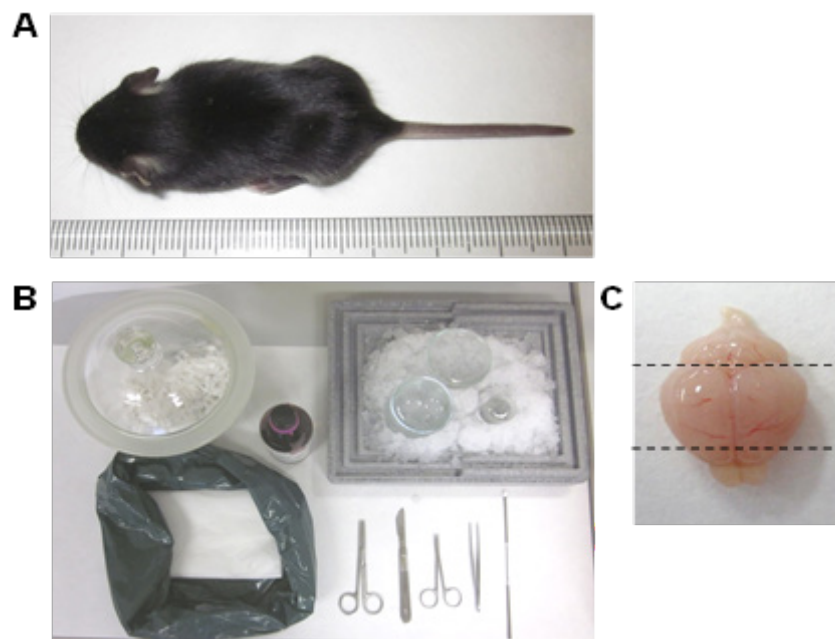


Figura 9: Extracción del cerebro. (A) Sujeto experimental, ratón C57Bl/6 de edad P15. (B) Material utilizado para la extracción del cerebro. (C) Extraído el cerebro, se eliminó la parte anterior y posterior (líneas discontinuas).

2. OBTENCIÓN DEL TEJIDO.

Los animales se anestesiaron con Isoflurano y se sacrificaron por decapitación para posteriormente extraer el cerebro (figura 9 B y C) colocándolo en una solución de ringer fría (0-24 °C) cuya composición es similar a la del líquido cerebroespinal (Tabla 1). Esta solución fue burbujeadada continuamente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂).

STOCK I				
SUSTANCIA	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mM)	1x (g/l)	10x (g/l)
NaCl	58,44	126,00	7,363	73,63
KCl	74,56	3,00	0,224	2,24
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	156,01	1,25	0,195	1,95
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,50	2,00	0,493	4,93
CaCl ₂ · 2H ₂ O	147,00	2,00	0,294	2,94
Glucosa	180,20	10,00	1,802	18,02

STOCK II

	PESO	CONCENTRACIÓN	1x	10x
SUSTANCIA	MOLECULAR	(mM)	(g/l)	(g/l)
NaHCO ₃	84,01	24,00	2,016	20,16

Tabla 1: Composición de la solución extracelular. Se prepararon dos stocks a partir de los cuales se elaboró diariamente solución extracelular; o ringer, empleado en el mantenimiento de las rodajas.

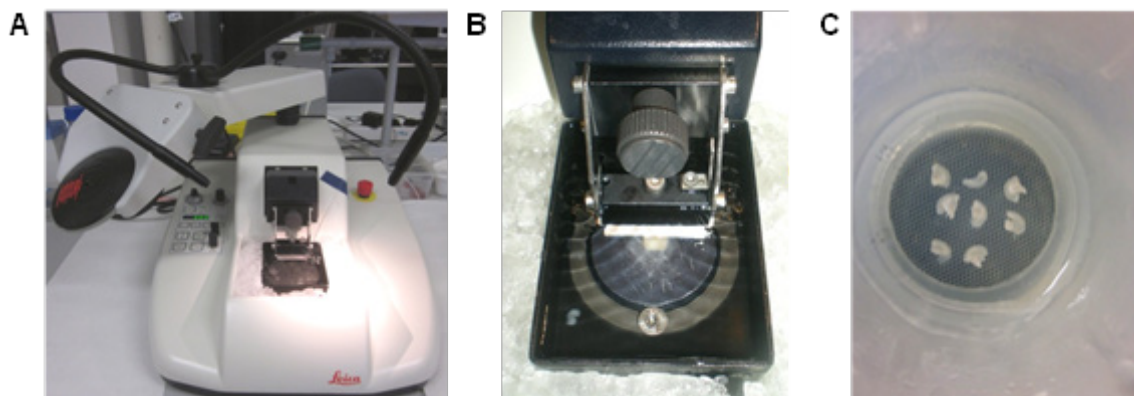


Figura 10: Preparación de rodajas. (A) Vibratomo utilizado, Leica, modelo VT 1000S. (B) El cerebro se fijó a la plataforma del vibratomo y se cortó en rodajas de 350 μm de grosor. (C) Las rodajas se mantuvieron en una cámara a temperatura ambiente y continuamente oxigenadas durante al menos una hora antes de su uso.

Se extrajo el cerebro y se fijó a la plataforma de un vibratomo (Leica, modelo VT 1000S) Fig 10 A, manteniendo el tejido en todo momento en ringer frío, Fig. 10 B. Se obtuvieron rodajas transversales de hipocampo de 350 μm de grosor. Las rodajas se colocaron para su recuperación en una cámara de incubación con ringer a temperatura ambiente continuamente oxigenado, Fig. 10 C, donde permanecieron al menos 1 hora antes de su uso.

3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

3.1 Diseño experimental.

Una vez que la rodaja se colocó en la cámara de registro estuvo en contacto continuo con solución extracelular oxigenada a una tasa de perfusión que dependió del experimento en curso.

Los experimentos se llevaron a cabo empleando la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa (*whole cell*) en el modo *current clamp*, a temperatura ambiente.

La región CA1 del hipocampo se localizó con ayuda del microscopio (Olympus, modelo BX51WI), bajo un objetivo de inmersión 10X. La célula a registrar se eligió de forma visual, atendiendo a su posición en el hipocampo y a su forma piramidal característica, con la ayuda del objetivo de inmersión 40X del microscopio utilizado (Fig. 10). Adicionalmente, las células se identificaron según su patrón de disparo característico.

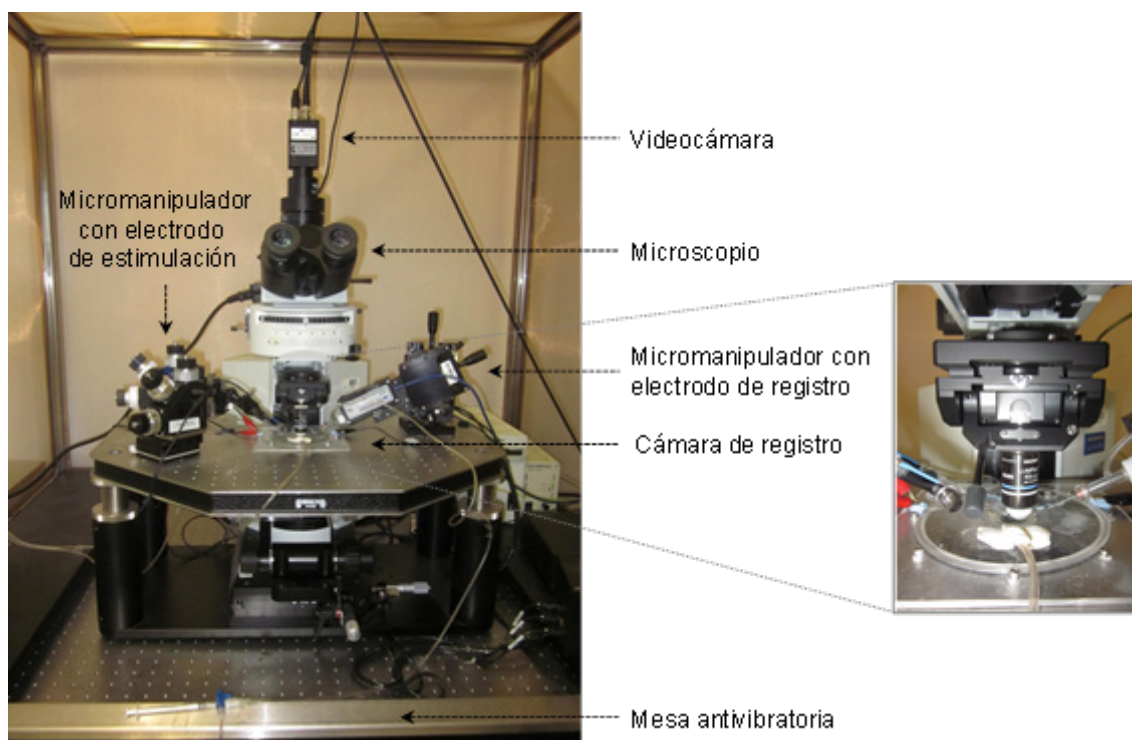


Figura 11: Microscopio utilizado para la realización de experimentos. Se muestran los distintos elementos que hicieron posible la colocación de la rodaja y su mantenimiento, la sujeción de los electrodos y la localización de las zonas de estimulación y registro. Una vez que la rodaja estuvo en la cámara de registro, continuamente bañada en la solución extracelular en movimiento gracias a una bomba peristáltica, se localizaron las zonas de estimulación y registro y se colocaron los electrodos con ayuda del microscopio y los micromanipuladores.

3.2 Registro de potenciales postsinápticos excitadores provocados (EPSPs).

Las pipetas de registro se fabricaron a partir de un capilar de vidrio borosilicato (con el estirador de pipetas horizontal P-97, Sutter Instruments) y se llenaron con una solución intracelular basada en gluconato (Tabla 2). Una vez rellenas con dicha solución, las pipetas de registro tuvieron una resistencia de 5-7 MΩ.

SUSTANCIA	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mM)	PESO (mg) (Para 50 ml)
Potassium D-gluconate (C ₆ H ₁₁ KO ₇)	234,25	110,00	1288,38
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	238,30	40,00	476,60
ATP-Mg	507,18	4,00	101,44
GTP Sodium Salt	523,00	0,30	7,85
NaCl	58.44	4,00	11,69

Tabla 2: Composición de la solución interna de current-clamp.

Algunos experimentos se realizaron en modo *voltaje-clamp*, en estos casos la solución interna utilizada fue:

SUSTANCIA	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mM)	PESO (mg) (Para 20 mL)
CsCl	168.4	140	471.52
EGTA*	380.4	0.2	1.5216
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	238,30	10,00	47.66
ATP-Mg	507,18	2,00	20.2872
GTP Sodium Salt	523,00	0,30	3.138
QX-314	343.30	5	34.33

Tabla 3: Composición de la solución interna de voltaje-clamp.

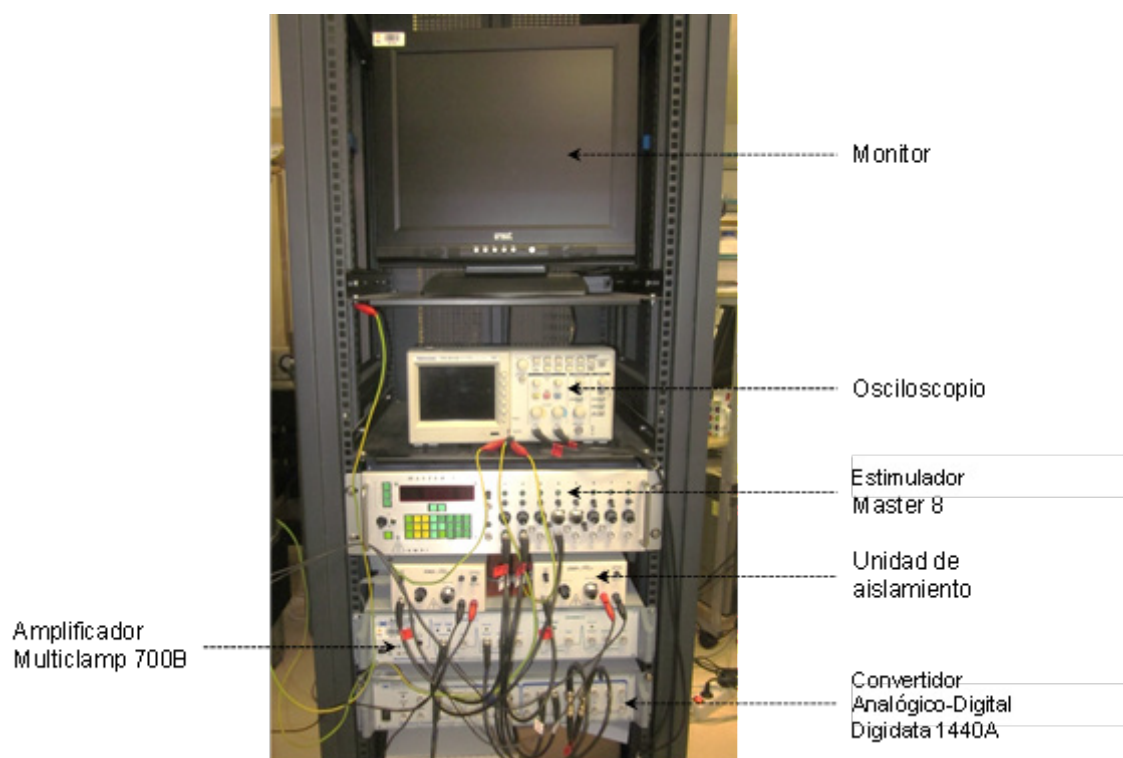


Figura 12: Equipo para el registro electrofisiológico. Se muestran los distintos componentes del equipo que se utilizó para estimular y registrar las rodajas.

Para provocar los EPSPs se aplicaron pulsos eléctricos a través de un electrodo monopolar empleando un estimulador (Master 8, A.M.P.I.), que controla la duración y la frecuencia del pulso eléctrico, y una unidad de aislamiento (ISOflex, A.M.P.I.) que controla la amplitud de dicho pulso, Fig 12. El electrodo de estimulación se colocó sobre las colaterales de Schaffer, en el *stratum radiatum*, Fig. 13. Adicionalmente, en la mayoría de los experimentos, se colocó un segundo electrodo de estimulación sobre las colaterales de Schaffer (estimulando un grupo de fibras diferentes a las estimuladas por el otro electrodo), obteniendo así una ruta como control en la que los protocolos no fueron aplicados.

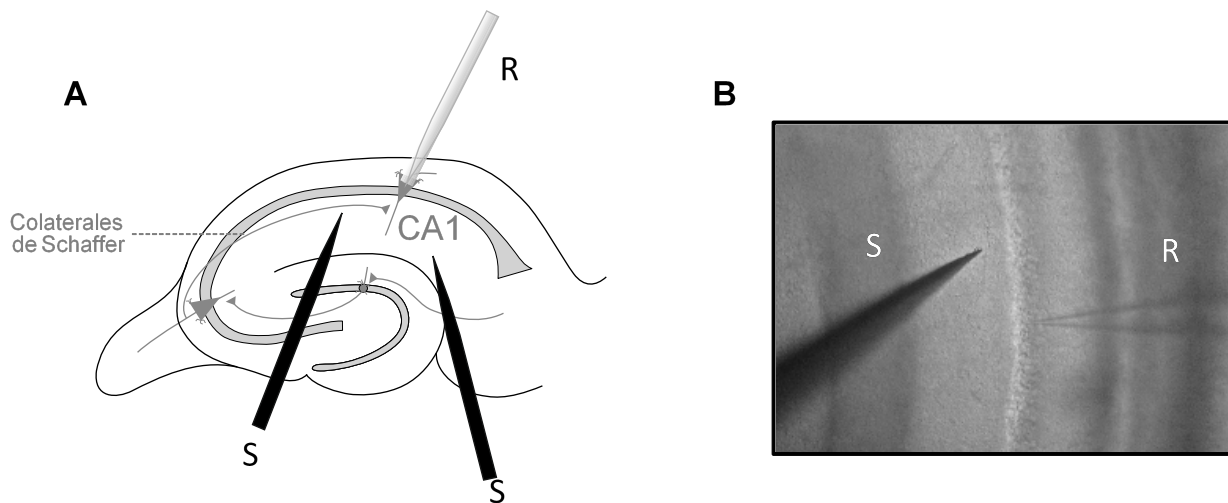


Figura 13: Ubicación de los electrodos. (A) Vista esquematizada. Los electrodos de estimulación (S) se colocaron sobre los axones de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo. El electrodo de registro (R) se colocó sobre el soma de una neurona piramidal de la región CA1 del hipocampo. (B) Imagen real tomada a 10X.

Los registros se obtuvieron con un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices), Fig 12. Las señales se filtraron a 2 KHz y se adquirieron a 10 KHz para almacenarlos en un ordenador y analizarlos posteriormente “off line”. Para ello se empleó el paquete de programas pClamp 10.2 (Molecular Devices).

Durante la realización de los experimentos, se observó en todo momento la resistencia en serie, y se descartaron todos aquellos experimentos en los que se produjo un cambio de resistencia superior al 15% a lo largo del mismo.

4. PROTOCOLOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS.

4.1 Protocolos para inducir spike timing-dependent plasticity (STDP).

Para el estudio de la *spike timing-dependent plasticity* en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de la región CA3 del hipocampo, se colocaron dos electrodos de estimulación sobre las colaterales de Schaffer evitando que dichos electrodos estimularan los mismos conjuntos de fibras. Un electrodo fue utilizado para estimular la ruta experimental (test) mientras que el otro se empleó para estimular la ruta control. Los potenciales excitadores postsinápticos evocados (eEPSPs) fueron provocados alternativamente en las dos rutas, a una frecuencia 0.2 Hz, mediante breves pulsos de corriente. La intensidad del estímulo fue ajustada para obtener eEPSPs con una amplitud entre 3 y 5 mV.

Se registraron eEPSPs durante un periodo estable de 10 minutos a una frecuencia de 0.2 Hz (línea base). Seguidamente se aplicó el protocolo de plasticidad, únicamente en la ruta experimental, pareando 100 veces el disparo de la célula postsináptica (inyectando pulsos de corriente en la neurona postsináptica a través de la pipeta de patch) con el eEPSP (pareamiento post-pre), Fig 14 A. La frecuencia de estimulación se mantuvo constante durante los experimentos. Los eEPSPs fueron monitorizados al menos durante 30 minutos después de aplicar el protocolo de plasticidad, Fig 14 B.

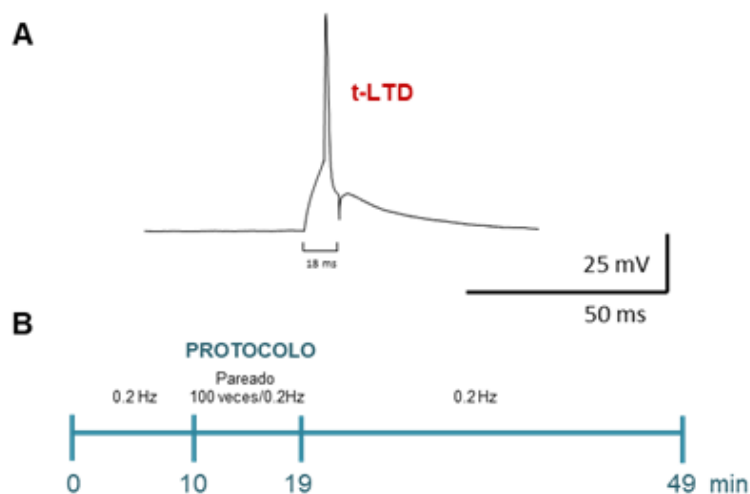


Figura 14: Diagrama del protocolo utilizado para la inducción de la STDP y curso temporal de los experimentos. (A) El protocolo de pareamiento post-pre. El intervalo temporal entre el pico de la espiga postsináptica y el comienzo del EPSP es de 18 ms. (B) Curso temporal de los experimentos. Se registraron eEPSPs a una frecuencia de 0.2 Hz y tras un periodo estable de 10 minutos, se aplicó el protocolo de pareamiento (100 pulsos) a la misma frecuencia, una vez finalizado el protocolo se registraron EPSPs durante al menos 30 minutos.

4.2 Protocolo de estimulación por pares de pulsos.

El protocolo de estimulación por pares de pulsos, necesario para obtener los datos del “Paired-Pulse Ratio” (PPR), consistió en aplicar 2 pulsos separados 40 ms, durante 60 segundos. Este protocolo se aplicó durante el inicio del registro de la línea base y al finalizar el experimento, 30 minutos después del pareamiento.

5. ANÁLISIS DE DATOS.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa Clampfit (del paquete pClamp, v. 10.2, Molecular Devices) y los gráficos se hicieron utilizando el programa SigmaPlot 11.

Para estimar los cambios en la eficacia sináptica en los experimentos de inducción de STDP se analizó la pendiente de los eEPSPs durante los últimos 5 minutos de registro y se compararon con los 5 últimos minutos de línea base. Además, se analizaron todos los eEPSPs de los experimentos para obtener el curso temporal de los mismos.

El PPR se expresó como la pendiente del segundo eEPSP dividida entre la pendiente del primer eEPSP siendo evaluado en antes y después de la aplicación del pareamiento en las diferentes condiciones experimentales.

Los datos obtenidos se expresaron como medias \pm EEM (error estándar de la media) y la significación estadística de las diferencias entre los distintos grupos evaluada a un nivel de $p < 0.05$, ó $p < 0.01$ empleando la prueba t de Student.

6. FARMACOLOGÍA Y PROTOCOLOS DE APLICACIÓN.

Los diferentes compuestos farmacológicos se adquirieron en las siguientes compañías:

Sigma Aldrich: BAPTA, tapsigargina, cloruro de zinc, Fluoracetato, GDP β S.

Tocris Bioscience Nimodipina, (+).MK801 maleato, D-AP5, PPDA, Ro 25-6981 maleato, CPTIO, L-NAME, Calfostin C, citrato de tetradotoxina, 2-AG, AM-251, THL, TBOA.

Los compuestos se disolvieron en agua en la mayoría de los casos y cuando esto no fue posible el compuesto se disolvió en DMSO (concentración final ~ 1% v/v DMSO). Las sales utilizadas para la solución interna y la solución externa se adquirieron de Sigma Aldrich.

Los compuestos farmacológicos utilizados fueron (según las necesidades del experimento):

- 1) Introducidos en la pipeta de registro para así introducirse de manera selectiva en la célula postsináptica o astrocito.
- 2) Aplicado en el baño durante 10 minutos para observar su efecto sobre la transmisión sináptica, con un lavado posterior de 30 minutos.
- 3) Incubado en presencia del compuesto farmacológico en cuestión durante una hora antes de comenzar el experimento siendo, cuando fue necesario, realizado el experimento también en presencia de este.

IV.Resultados

1. RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE GLUTAMATO DE TIPO NMDA EN EL HIPOCAMPO DE RATONES DE 13 A 21 DÍAS (P13-21).

Los receptores de tipo NMDA pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos de glutamato junto a los receptores de tipo AMPA y de tipo kainato. Estos receptores están ampliamente distribuidos en todo el cerebro y son importantes mediadores de la transmisión sináptica (Paoletti et al. 2013). Aunque han sido descritos clásicamente como receptores postsinápticos, la existencia de receptores presinápticos de tipo NMDA ha sido firmemente establecida, aunque no así sus funciones debido a las limitaciones técnicas para poder estudiarlos (Rodríguez-Moreno et al. 2010; Bouvier et al. 2018).

En la primera parte de esta memoria se describe la presencia y el rol modulador de los receptores presinápticos de tipo NMDA (preNMDAR) en el hipocampo en ratón postnatal de 13 a 21 días (P13-21), así como su composición en subunidades y su mecanismo de acción en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo de ratón.

1.1 Existen receptores de tipo NMDA presinápticos tónicamente activos a P13-21 mediando un aumento en la probabilidad de liberación de glutamato en la sinapsis establecida entre axones de neuronas piramidales de la región CA3 y dendritas de neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo.

Para determinar si existen receptores presinápticos de NMDA en la sinapsis CA3-CA1 se obtuvieron registros (respuestas evocadas y espontáneas de tipo miniatura) de neuronas de la región CA1 de hipocampo de ratones desde el día postnatal 13 (P13) hasta el día postnatal 21 (P21) utilizando la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa. Para asegurar que los receptores de tipo NMDA que se estudian no son postsinápticos, se cargó en la pipeta de patch una concentración 1 mM de MK-801 para bloquear los receptores ionotrópicos postsinápticos de tipo NMDA en la célula bajo registro. En estas condiciones experimentales, la aplicación en el baño de una concentración 50 μ M de ácido D-2-amino5-fosfopentanónico (D-AP5) provocó una disminución en la pendiente de los potenciales postsinápticos excitadores evocados (eEPSP) por estimulación en las colaterales de Schaffer del $33\pm 7\%$, $n=6$, Fig. 15 A, una modificación que fue reversible tras el lavado de D-AP5. Estos resultados indican la existencia de receptores de NMDA no postsinápticos (putativamente presinápticos) tónicamente activos que median un aumento en la liberación de glutamato. La activación tónica de estos receptores de tipo NMDA no se ve influida por la temperatura a la que se realizaron los experimentos ($22-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) ya que se obtuvieron los mismos resultados a una temperatura más fisiológica ($32-33\text{ }^{\circ}\text{C}$), con una disminución del $35\pm 9\%$ en la amplitud de los eEPSP, $n=6$.

Para estudiar el efecto de la activación de estos receptores presinápticos de tipo NMDA (PreNMDARs) en la liberación espontánea de glutamato en las fibras colaterales de Schaffer, se bloquearon de nuevo los receptores postsinápticos de tipo NMDA introduciendo MK-801 1mM en la célula postsináptica antes de medir los efectos de D-AP5 (10 min) sobre los potenciales postsinápticos excitadores miniatura (mEPSPs), en presencia de TTX (500 nM). Se encontró que D-AP5 produce una disminución en la frecuencia de los mEPSP (línea base: $0.33\pm 0.01\text{ Hz}$, $n=7$; D-AP5: $0.22\pm 0.01\text{ Hz}$, $n=7$, Fig. 15 Bi, sin efecto en la amplitud (línea base $0.38\pm 0.03\text{ mV}$, $n=6$; D-AP5: $0.36\pm 0.02\text{ mV}$, $n=7$) Fig. 15 Bii.

Estos resultados fueron los mismos cuando se realizaron a una temperatura más fisiológica ($32-33\text{ }^{\circ}\text{C}$) e indican que existen receptores presinápticos de tipo NMDA tónicamente activos que median un aumento en la liberación de glutamato en las sinapsis CA3-CA1.

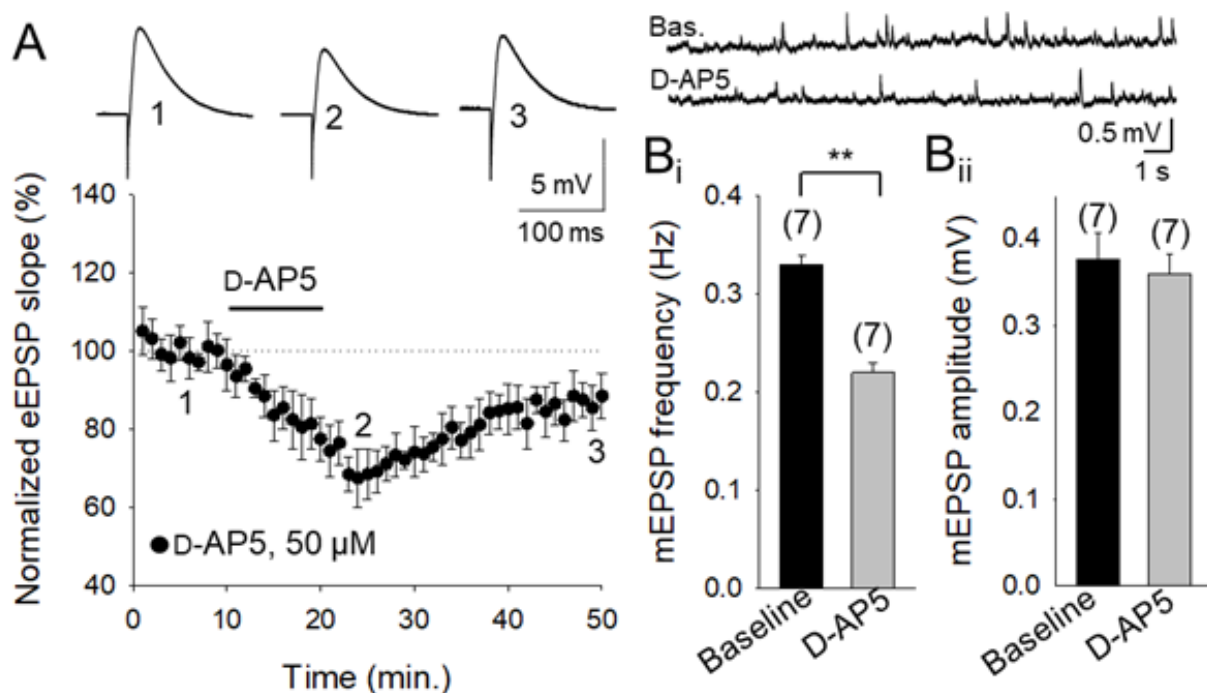


Figura 15: Receptores de NMDA presinápticos tónicamente activos en las sinapsis CA3-CA1. (A) Curso temporal de la respuesta evocada (eEPSP) a P13-21 con la neurona postsináptica cargada con MK-801 1 mM. En estas condiciones una aplicación de D-AP5 50 μ M induce una disminución de la pendiente y amplitud de los eEPSP. Los trazos muestran los eEPSP durante la línea base (1) la aplicación de D-AP5 50 μ M (2) y tras el lavado de D-AP5 (3). (B) La actividad espontánea miniatura (mEPSP) también se ve disminuida en estas condiciones experimentales. Disminuye la frecuencia de los mEPSPs pero no su amplitud. El error representa el error estándar y el número de rodajas se expresa entre paréntesis: ** $p < 0.01$, Test de t de Student.

Para comprobar si este efecto pudiera deberse a un posible rol metabotrópico de los receptores de tipo NMDA (Nabavi et al. 2013), se monitorizaron eEPSP y mEPSP añadiendo MK-801 (500 μ M) al baño después de haber introducido en la neurona postsináptica una concentración 1 mM de MK-801. En estas condiciones experimentales, la pendiente de los eEPSP disminuye claramente en presencia de MK-801 ($69 \pm 7\%$, $n=7$ Fig. 16 A) y también la frecuencia de los mEPSP pero no su amplitud (Frecuencia, línea base: 0.36 ± 0.01 Hz, $n=6$; MK-801: 0.25 ± 0.01 Hz, $n=6$. Amplitud, línea base: 0.38 ± 0.01 mV, $n=6$; MK-801: 0.40 ± 0.02 mV, $n=6$, Fig. 16 B). Estos resultados sugieren que los efectos observados son debidos a una actividad ionotrópica de los receptores no postsinápticos de tipo NMDA.

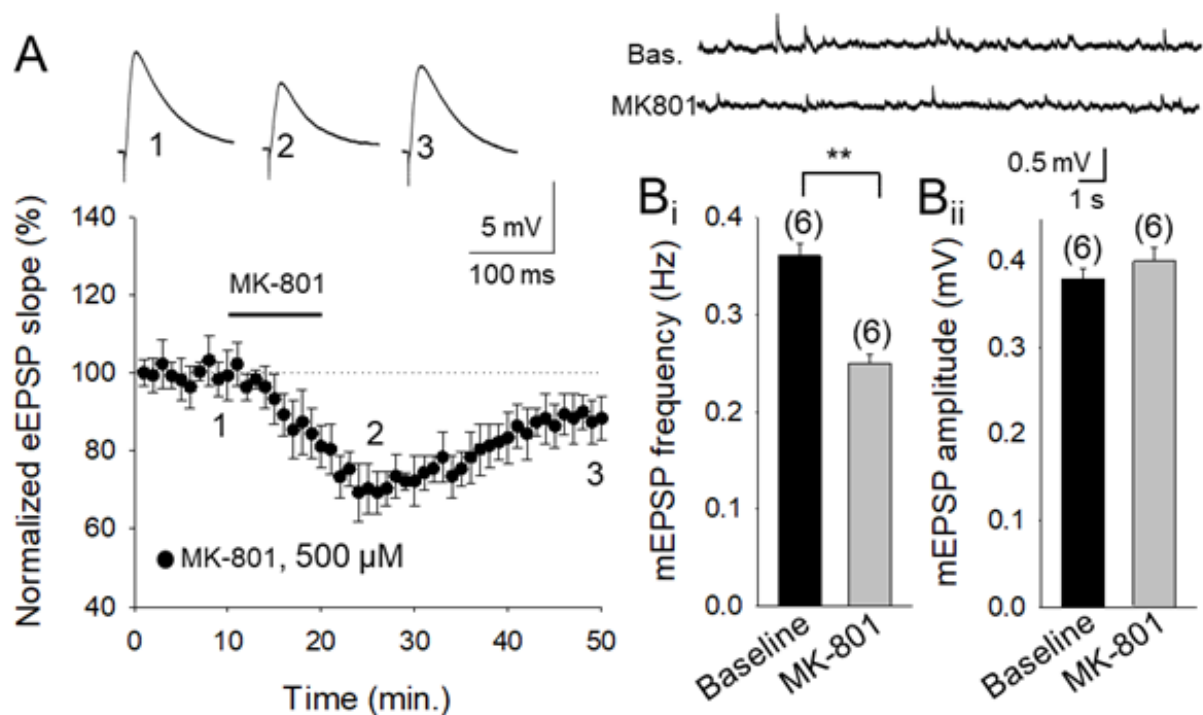


Figura 16: Los receptores presinápticos de tipo NMDA son ionotrópicos. (A) Curso temporal de la respuesta evocada (eEPSP) a P13-21 con la célula postsináptica cargada de MK-801 1 mM y aplicación en el baño de MK-801 500 μ M. La aplicación de MK-801 reduce la pendiente de los eEPSP. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) la aplicación de MK-801 500 μ M (2) y tras el lavado de MK-801 (3). (B) La actividad espontánea miniatura (mEPSP) también se ve afectada en estas condiciones experimentales. Disminuye la frecuencia de los mEPSPs pero no su amplitud. El error representa el error estándar y el número de rodajas se manifiesta en paréntesis: ** $p < 0.01$, Test de t de Student.

1.2 Los receptores presinápticos de tipo NMDA están compuestos por las subunidades GluN2B/GluN2C/2D.

1.2.1 El aumento de la liberación de glutamato está mediado por la activación tónica de receptores presinápticos de tipo NMDA que no contienen la subunidad GluN2A.

Para determinar si la activación tónica y la facilitación de la liberación de glutamato dependen de receptores que contengan la subunidad GluN2A, se utilizó el antagonista específico para receptores de tipo NMDA que contienen esta subunidad, Zn^{2+} (Bidoret et al. 2009; Andrade-Talavera et al. 2016). La pendiente de los eEPSP no cambió en presencia de Zn^{2+} (Zn^{2+} : $104 \pm 3\%$, $n = 6$. D-AP5: $67 \pm 6\%$, $n = 6$. Fig 17), indicando que los receptores presinápticos de tipo NMDA tónicamente activados que modulan la pendiente y amplitud de los eEPSP no contienen la subunidad GluN2A.

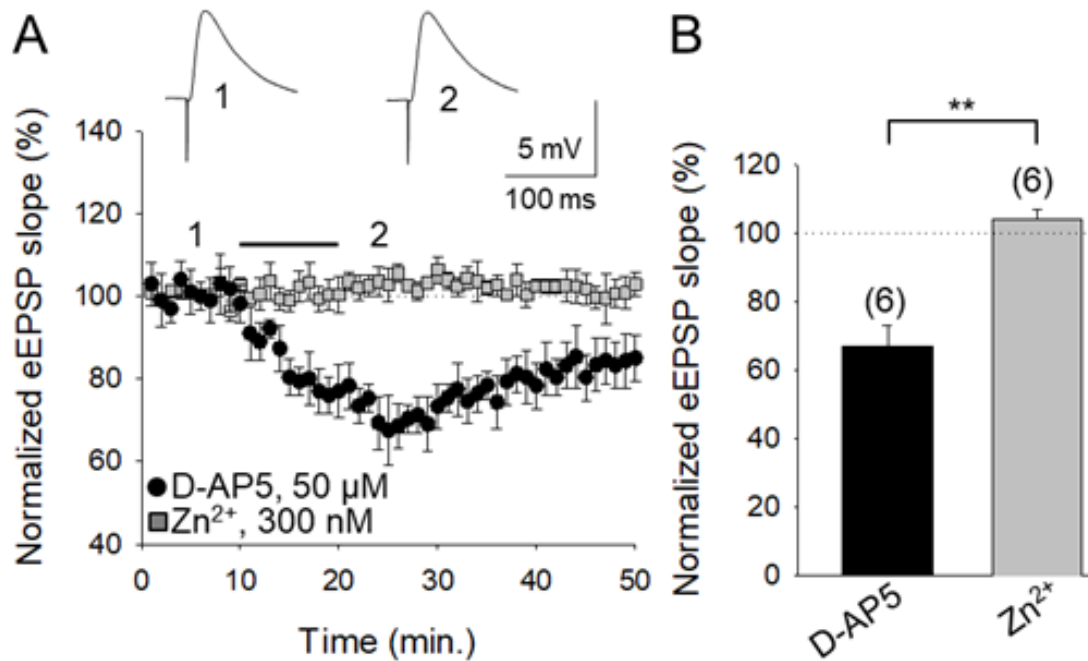


Figura 17: Los receptores presinápticos de NMDA que deprimen la pendiente y amplitud de eEPSP en la sinapsis CA3-CA1 no contienen la subunidad GluN2A. (A) Con la neurona postsináptica cargada con MK-801, la adición de Zn^{2+} no afecta a la pendiente o la amplitud del eEPSP. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y durante la aplicación de D-AP5 o Zn^{2+} (2). (B) Resumen de resultados. El error representa el error estándar y el número de rodajas se manifiesta en paréntesis: ** $p < 0.01$, Test de t de Student.

Seguidamente, se estudió el efecto de Zn^{2+} sobre la liberación espontánea de glutamato (mEPSP) en presencia de TTX en la misma sinapsis, bloqueando de nuevo los receptores postsinápticos de tipo NMDA con MK-801 1 mM en la célula postsináptica. Cuando se midieron los efectos en frecuencia y amplitud de los mEPSP se encontró que Zn^{2+} no afectaba a la frecuencia de los mEPSP (Zn^{2+} , línea base: 0.40 ± 0.05 Hz, $n = 7$; Zn^{2+} : 0.41 ± 0.07 Hz, $n = 7$. D-AP5, línea base: 0.38 ± 0.015 Hz, $n = 6$; D-AP5: 0.28 ± 0.011 Hz, $n = 6$. Fig. 18 A) o su amplitud (línea base: 0.38 ± 0.03 mV, $n = 7$; Zn^{2+} : 0.42 ± 0.043 mV, $n = 7$. D-AP5: línea base: 0.40 ± 0.04 mV, $n = 6$; DAP5: 0.39 ± 0.03 mV, $n = 6$. Fig. 18 B). De esta manera, así como se observó sobre las respuestas evocadas, la liberación espontánea de glutamato no dependiente de potenciales de acción esta mediada por receptores NMDA presinápticos tónicamente activos que no contienen la subunidad GluN2A.

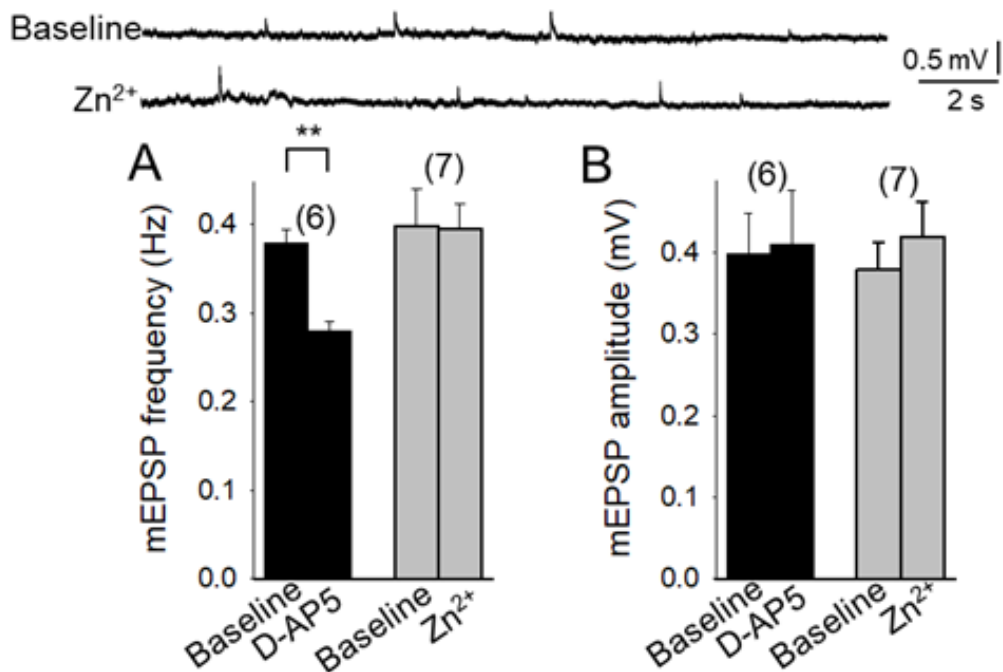


Figura 18: El antagonismo de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A no afecta a la frecuencia de los mEPSP. Los mEPSPs fueron monitorizados durante la línea base y después de la exposición de las neuronas a Zn²⁺ en presencia de TTX (500 nM), en ambos casos con la neurona postsináptica cargada con MK-801 (1 mM). (A, B) Histogramas que muestran que el Zn²⁺ no afecta a la frecuencia ni a la amplitud de los mEPSP. Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas viene indicado en paréntesis. ** $p < 0.01$, Test de t Student.

1.2.2 Los receptores presinápticos de tipo NMDA que median un aumento de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 contienen la subunidad GluN2B.

Posteriormente, se comprobó si estos receptores de glutamato contienen la subunidad GluN2B. Para ello se utilizó el antagonista para receptores de NMDA que contienen esta subunidad, Ro 25-6981 (Fischer et al. 1997; Banerjee et al. 2009; Rodríguez-Moreno et al. 2010; Andrade-Talavera et al. 2016). Con la neurona postsináptica cargada con MK-801 1 mM, Ro 25-6981 (0.5 μ M) indujo una disminución de la pendiente de los eEPSP muy similar a la obtenida con D-AP5 (Ro 25-6981: $69 \pm 8\%$, $n = 6$. DAP5: $64 \pm 6\%$, $n = 6$. Fig. 19 A, B), indicando que estos receptores contienen la subunidad GluN2B.

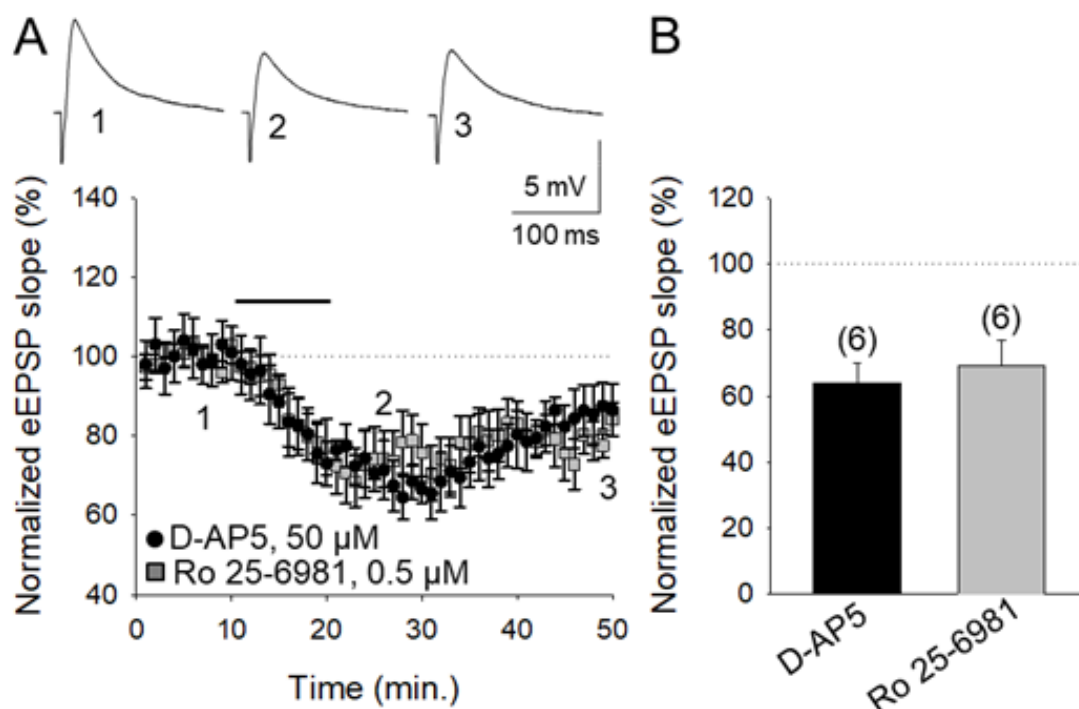


Figura 19: Los receptores presinápticos de NMDA que deprimen la pendiente y amplitud de eEPSP en la sinapsis CA3-CA1 contienen la subunidad GluN2B. (A) Con la neurona postsináptica cargada con MK-801, la adición de Ro 25-6981 0.5 μ M disminuye la pendiente de eEPSP. Los trazos muestran el EPSP durante la línea base (1), en presencia de Ro 25-6981 (2), y al final del experimento (3). (B) Resumen de los resultados. Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas viene indicado en paréntesis.

Seguidamente, se evaluó el efecto de Ro 25-6981 sobre la frecuencia de mEPSP en presencia de TTX (500 nM) cuando los receptores postsinápticos de NMDA fueron bloqueados con MK-801 (1 mM) en la célula postsináptica. La aplicación de Ro 25-6981 durante 10 minutos redujo la frecuencia de los mEPSPs (línea base: 0.39 ± 0.02 Hz, $n = 6$. Ro 25-6981: 0.24 ± 0.01 Hz, $n = 6$. Fig. 20 A) pero no tuvo ningún efecto en su amplitud (línea base: 0.38 ± 0.05 mV, $n = 7$. Ro 25-6981: 0.39 ± 0.04 mV, $n = 6$. Fig 20 B.) de forma similar a lo observado para el D-AP5 (Frecuencia, línea base: 0.42 ± 0.02 Hz, $n = 6$. D-AP5: 0.26 ± 0.02 Hz, $n = 6$. Amplitud, línea base: 0.40 ± 0.06 mV, $n=6$. D-AP5: 0.42 ± 0.05 mV, $n = 6$. Fig. 20 A, B). Estos resultados indican que el aumento de liberación de glutamato observado involucra a receptores presinápticos de NMDA que contienen la subunidad GluN2B.

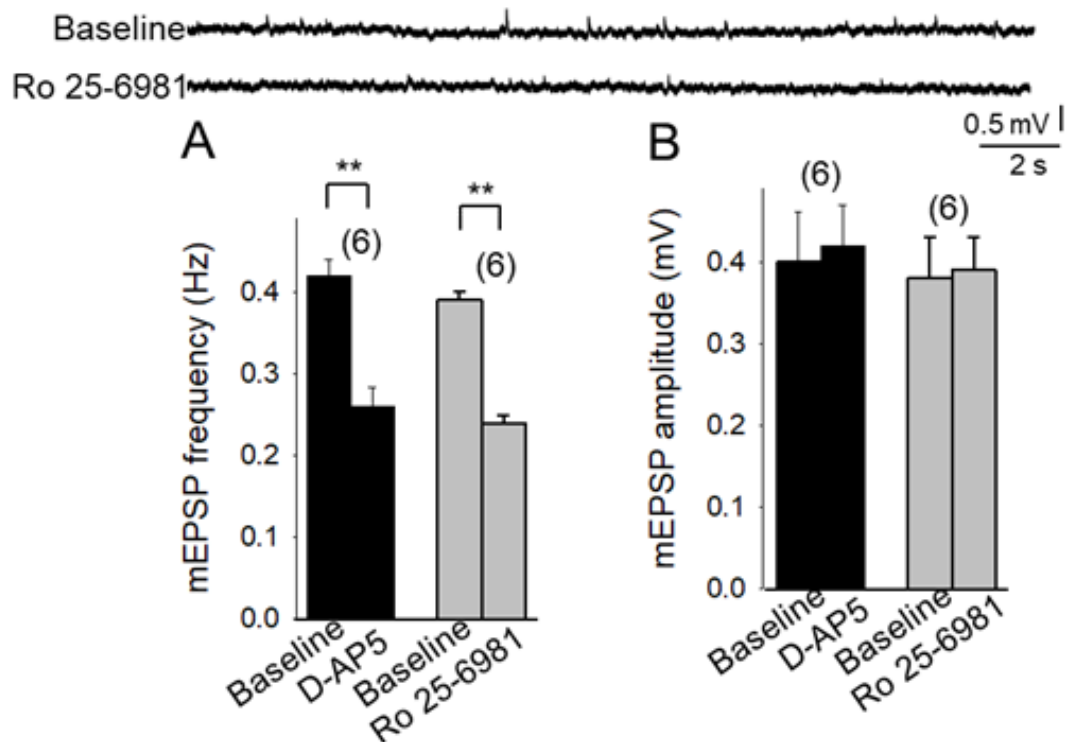


Figura 20: El antagonismo de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B disminuye la frecuencia de los mEPSP. Los mEPSPs se monitorizaron durante la línea base y después de la aplicación de Ro 25-6981 en presencia de TTX (500 nM) y con la neurona postsináptica cargada con MK-801 (1 mM). Los histogramas muestran como Ro 25-6981 disminuye la frecuencia de los mEPSPs (A) pero no la amplitud (B). Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas se muestra entre paréntesis. ** $p < 0.01$. Test de t de Student.

1.2.3 Los receptores presinápticos de tipo NMDA que median un aumento de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 contienen la subunidad(es) GluN2C/2D.

La posibilidad de que se encuentren involucradas las subunidades GluN2C/2D en este fenómeno fue investigado usando PPDA, un antagonista competitivo de receptores de tipo NMDA que contienen las subunidades GluN2C/2D. (Morley et al. 2005). La aplicación en el baño de PPDA (10 μ M) disminuyó la pendiente del eEPSP de manera similar al efecto del D-AP5 (PPDA: $63 \pm 6\%$, $n = 6$. D-AP5: $72 \pm 7\%$, $n = 7$. Fig. 21 A, B).

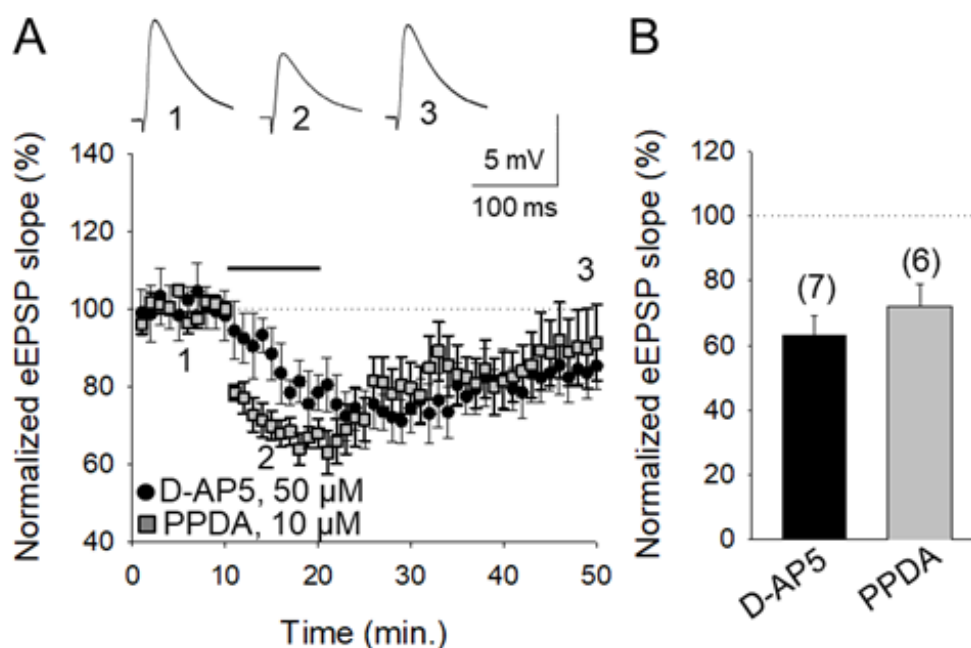


Figura 21: El antagonismo de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/2D disminuye la pendiente y amplitud de los eEPSP. (A) Con la neurona postsináptica cargada con MK-801 (1 mM), la adición de PPDA (10 μ M) disminuye la pendiente de eEPSP. Los trazos muestran la disminución observada con la aplicación de PPDA en la línea base (1), en presencia de PPDA (2), y al final del experimento con PPDA (3). (B) Resumen de resultados. Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas se muestra entre paréntesis. En colaboración con Yuniesky Andrade Talavera.

Seguidamente se estudió el efecto del PPDA sobre los mEPSP, bloqueando de nuevo los receptores postsinápticos de tipo NMDA con MK-801 1 mM. En presencia de TTX (500 nM) la aplicación durante 10 minutos de PPDA redujo la frecuencia (línea base: 0.41 ± 0.02 Hz, $n = 6$. PPDA: 0.26 ± 0.02 Hz, $n = 7$. Fig. 21 A) pero no la amplitud (línea base: 0.39 ± 0.03 mV, $n=6$. PPDA: 0.41 ± 0.04 mV, $n = 7$. Fig. 21 B) de los mEPSP tal y como ocurría con D-AP5 (Frecuencia, línea base: 0.44 ± 0.03 Hz, $n = 6$; D-AP5: 0.28 ± 0.02 Hz, $n = 6$. Amplitud, línea base: 0.43 ± 0.03 mV. D-AP5: 0.40 ± 0.04 mV, $n = 6$. Fig. 21 A). Estos resultados indican que los receptores tónicamente activos de tipo NMDA que modulan la pendiente y amplitud de las respuestas evocadas y la frecuencia de las respuestas espontáneas miniatura contienen las subunidades GluN2C/2D.

Juntos, estos resultados indican que el aumento de la liberación de glutamato involucra receptores de tipo NMDA presinápticos que contienen las subunidades GluN2B y GluN2C/D que están activados de forma tónica en la sinapsis de CA3-CA1.

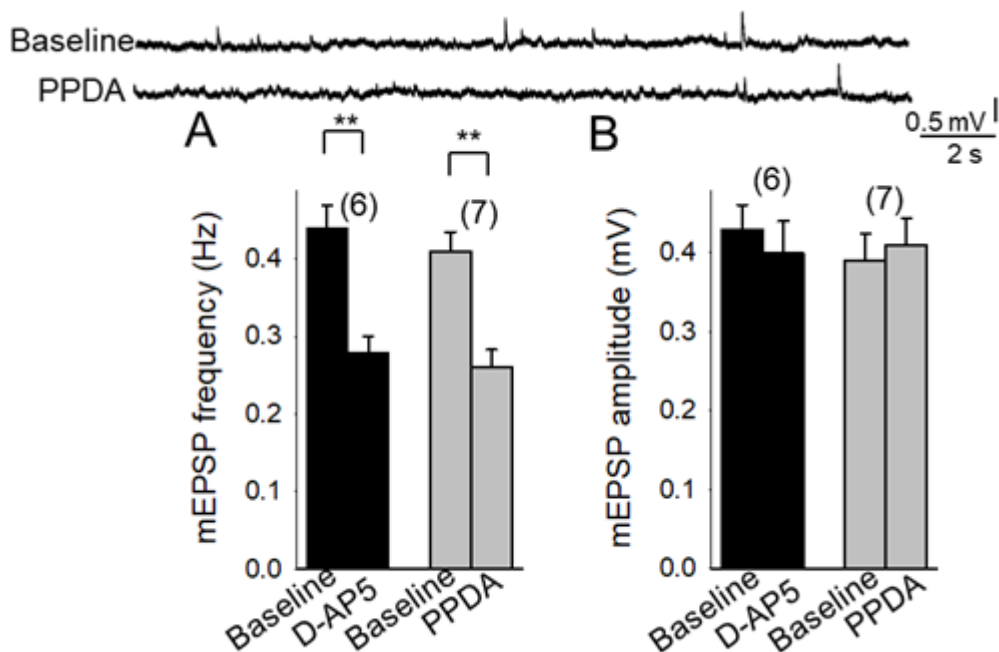


Figura 22: El antagonismo de receptores presinápticos de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/2D disminuye la frecuencia de mEPSP. Los mEPSP se monitorizaron durante la línea base y después de exponer a las neuronas a PPDA (10 μ M) en presencia de TTX (500 nM) con la neurona postsináptica cargada con MK-801 1 (mM). Los histogramas muestran una disminución de la frecuencia de mEPSPs (A) pero no de su amplitud (B). Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas se muestra entre paréntesis. $**p < 0.01$, Test de t de Student. En colaboración con Yuniesky Andrade Talavera.

1.3 La facilitación de la liberación de glutamato mediada por la activación de receptores de tipo NMDA presinápticos requiere de la activación de la proteína quinasa A.

La activación tónica de los receptores presinápticos de tipo NMDA está mediada por la proteína quinasa C en la corteza visual (Kunz et al. 2013), pero no se conoce si un mecanismo similar existe en el hipocampo. Para averiguarlo, se examinó la influencia de dos inhibidores, de la proteína quinasa A y la proteína quinasa C, sobre los eEPSP y mEPSP en la sinapsis CA3-CA1.

En rodajas incubadas con 0.5 μ M de calfstin C (bloqueador de PKC) el efecto de D-AP5 sobre el eEPSP permaneció inalterado, provocando una disminución similar a la observada en ausencia de tratamiento con calfstin C ($70 \pm 7\%$ en presencia de calfstin C, $n = 6$ vs $67 \pm 6\%$, $n = 6$ en rodajas no tratadas, Fig. 23 A, B). indicando que la activación de PKC no es necesaria para los efectos observados sobre el eEPSP.

Seguidamente, se repitieron los experimentos en presencia de H-89 para determinar si la PKA es necesaria para la modulación de la liberación de glutamato en esta sinapsis. La PKA se ha demostrado que interviene en la liberación de glutamato y en LTP en diferentes sinapsis (Huganir y Nicoll, 2013; Rodríguez-Moreno y Sihra, 2013). Cuando las rodajas fueron incubadas en presencia del inhibidor de la proteína quinasa A H-89 (2 μ M), la aplicación posterior de D-AP5 no disminuyó la pendiente de los eEPSP ($102 \pm 7\%$, $n = 7$ en H-89 vs $67 \pm 6\%$, $n = 6$ en rodajas no tratadas, Fig. 23 A, B), indicando que se requiere de la activación de la proteína quinasa A para la modulación observada.

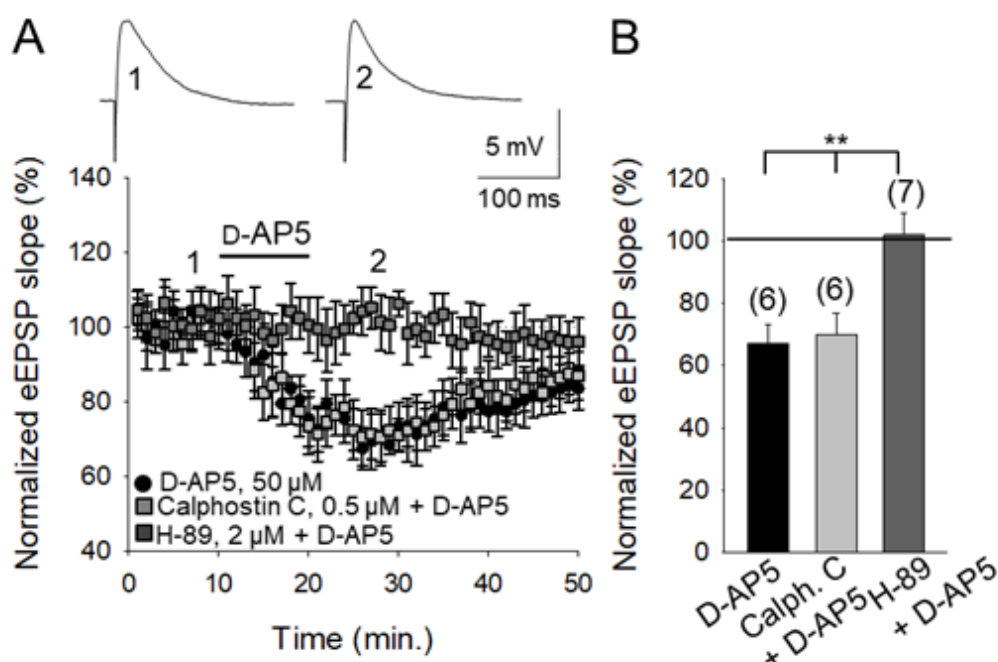


Figura 23: La disminución de la pendiente y amplitud de los eEPSP en la sinapsis CA3-CA1 involucra a la proteína quinasa A. (A) Curso temporal de los eEPSP en neuronas a las que se les ha aplicado D-AP5 50 μ M en tres condiciones: sin incubar la rodaja, preincubando la rodaja 1 hora en presencia de calphostin C y preincubando la rodaja 1 hora en presencia de H-89. Los trazos muestran el eEPSP del experimento de H-89 durante la línea base (1) y durante la aplicación de D-AP5 (2). (B) Resumen de resultados. Los histogramas muestran el valor del evocado durante el máximo efecto del D-AP5. Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas se muestra entre paréntesis. ** $p < 0.01$. Test de t de Student.

Seguidamente se repitieron los experimentos monitorizando mEPSP. En presencia de calphostin C, D-AP5 disminuyó la frecuencia de mEPSP al igual que se observó en rodajas no tratadas (calphostin C, línea base: 0.42 ± 0.022 Hz; D-AP5: 0.26 ± 0.02 Hz, $n = 7$; Rodajas no tratadas, línea base: 0.40 ± 0.01 Hz, $n = 6$. D-AP5: 0.25 ± 0.02 Hz, $n = 6$. Fig. 24 C). En presencia de H-89 la aplicación de D-AP5 no disminuyó la frecuencia de mEPSP (H-89, línea base: 0.38 ± 0.01 Hz. D-AP5: 0.41 ± 0.03 Hz, $n = 7$. Fig. 24 A; Rodajas no tratadas, línea base: 0.40 ± 0.01 Hz, $n = 6$. D-AP5: 0.25 ± 0.02 Hz, $n = 6$. Fig. 24 A). Estos resultados indican que el aumento de la liberación de glutamato mediado por la activación de receptores de glutamato de tipo NMDA presinápticos activados de forma tónica requiere de la activación de la proteína quinasa A, en las sinapsis CA3-CA1 de hipocampo.

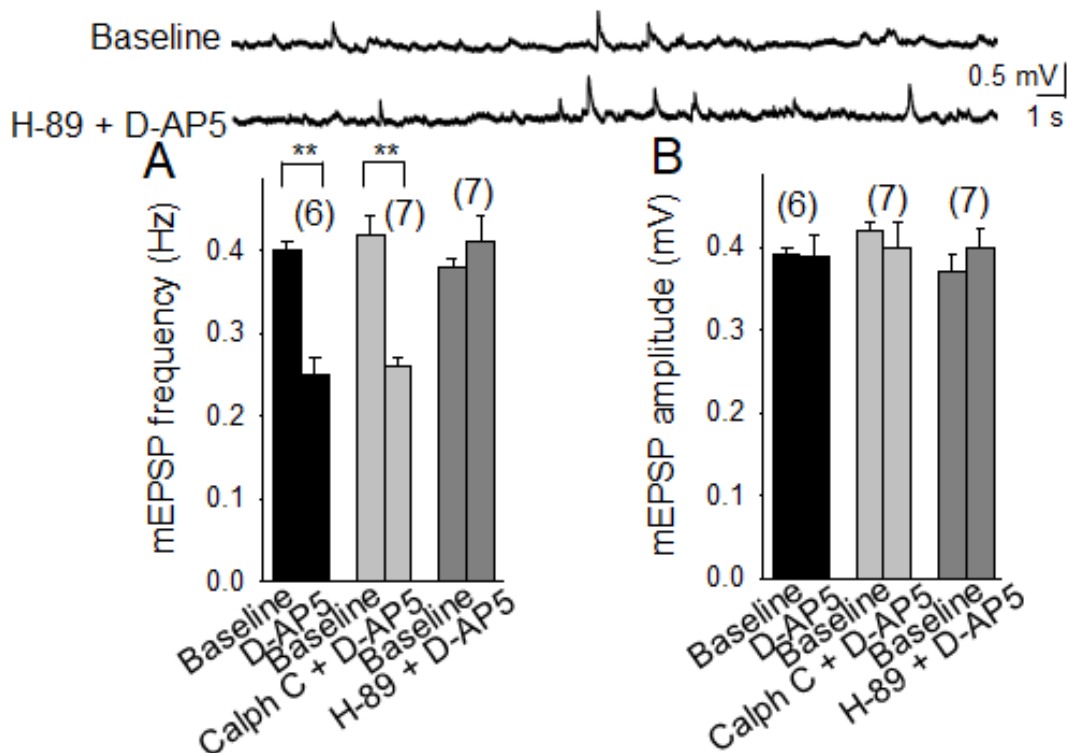


Figura 24: La disminución de la frecuencia de mEPSP en la sinapsis CA3-CA1 involucra a la proteína quinasa A. Se muestran los trazos durante la línea base y la aplicación de D-AP5 de las neuronas pertenecientes a rodajas incubadas en H-89 (inhibidor de PKA). (A) Histogramas de la frecuencia de mEPSP en rodajas no incubadas, rodajas incubadas en calfostin C y en H-89, durante la línea base y durante la aplicación de D-AP5. (B) Histogramas de la amplitud de mEPSP en rodajas no incubadas, rodajas incubadas en calfostin C y en H-89, durante la línea base y durante la aplicación de D-AP5. Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas se muestra entre paréntesis. ** $p < 0.01$. Test de t de Student.

Para confirmar la composición de subunidades (GluN2B/GluN2C/2D) de los receptores presinápticos de tipo NMDA que activan a la PKA para producir un aumento en la liberación de glutamato, se llevaron a cabo experimentos preincubando las rodajas con calfostin C o H-89 y con una aplicación durante el experimento de Ro 25-6981 o PPDA durante 10 minutos.

El efecto de Ro 25-6981 sobre los eEPSPs y los mEPSPs fue prevenido en presencia de H-89 pero no de calfostin C, de manera similar a como ocurrió con D-AP5:

eEPSP. Calfostin C: $70 \pm 5\%$, $n=7$. H-89: $104 \pm 8\%$, $n=6$. Rodajas no tratadas: $66 \pm 6\%$, $n=8$. Fig. 25 A, B.

Frecuencia de mEPSP. Calfostin C. Línea base: 0.38 ± 0.02 Hz, calfostin C: 0.22 ± 0.01 Hz, $n=6$; H-89. Línea base: 0.37 ± 0.01 Hz, H-89: 0.42 ± 0.03 Hz, $n=6$. Ro 25-6981. Línea base: 0.38 ± 0.01 Hz, Ro 25-6981: 0.21 ± 0.02 Hz, $n=6$, en rodajas no tratadas, Fig. 25 C_i.

Amplitud de mEPSP. Calfostin C. Línea base: 0.40 ± 0.01 mV, calfostin c: 0.41 ± 0.03 mV, $n=6$; H-89. Línea base: 0.40 ± 0.01 mV, H-89: 0.41 ± 0.03 mV, $n=6$, Ro 25-6981: Línea base: 0.41 ± 0.01 mV, Ro-25689: 0.39 ± 0.02 mV, $n=6$, en rodajas no tratadas, Fig. 25 C_{ii}.

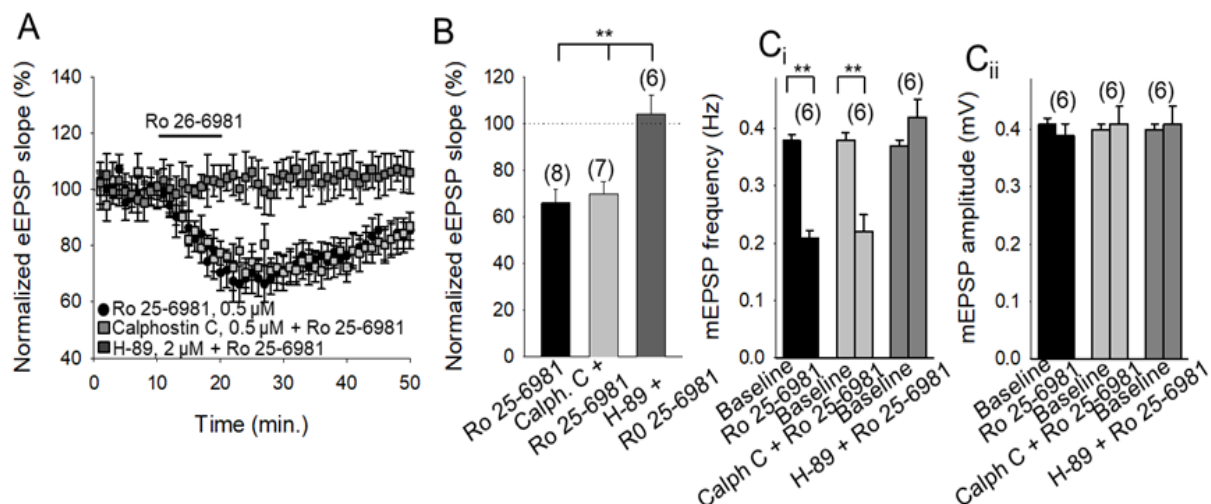


Figura 25: La facilitación de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 involucra la activación de receptores que contienen la subunidad GluN2B y la posterior activación de PKA. (A) Curso temporal de los eEPSP en neuronas a las que se les ha aplicado Ro 25-6981 0.5 μ M durante 10 minutos después de una línea base estable en tres condiciones: sin incubar la rodaja, preincubando la rodaja 1 hora en presencia de calphostin C y preincubando la rodaja 1 hora en presencia de H-89. (B) Resumen de resultados. (Ci, Cii) Efectos sobre los mEPSP. Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas se muestra entre paréntesis. ** $p < 0.01$. Test de t de Student.

El efecto de PPDA sobre los eEPSPs y los mEPSPs fue prevenido en presencia de H-89, pero no de calphostin C, de manera similar a como ocurrió con D-AP5:

eEPSP. Calphostin C: $70 \pm 8\%$, $n = 6$; H-89: $98 \pm 6\%$, $n = 6$; PPDA: $65 \pm 7\%$, $n = 7$ en rodajas no tratadas, Fig. 26 A, B.

Frecuencia de mEPSP. Calphostin C. Línea base: 0.40 ± 0.01 Hz, 0.24 ± 0.02 Hz, $n = 7$; H-89: línea base 0.39 ± 0.01 Hz, 0.41 ± 0.02 Hz, $n = 6$; PPDA: Línea base: 0.42 ± 0.01 , PPDA: 0.25 ± 0.02 Hz, $n = 6$, en rodajas no tratadas, Fig. 26 C_i.

Amplitud de mEPSP. Calphostin C. Línea base: 0.39 ± 0.01 mV, 0.40 ± 0.02 mV, $n = 7$; H-89: Línea base: 0.41 ± 0.01 mV, H-89: 0.41 ± 0.02 mV, $n = 6$; PPDA: Línea base: 0.38 ± 0.01 mV, PPDA: 0.41 ± 0.01 mV, $n = 6$, en rodajas no tratadas, Fig. 26 C_{ii}.

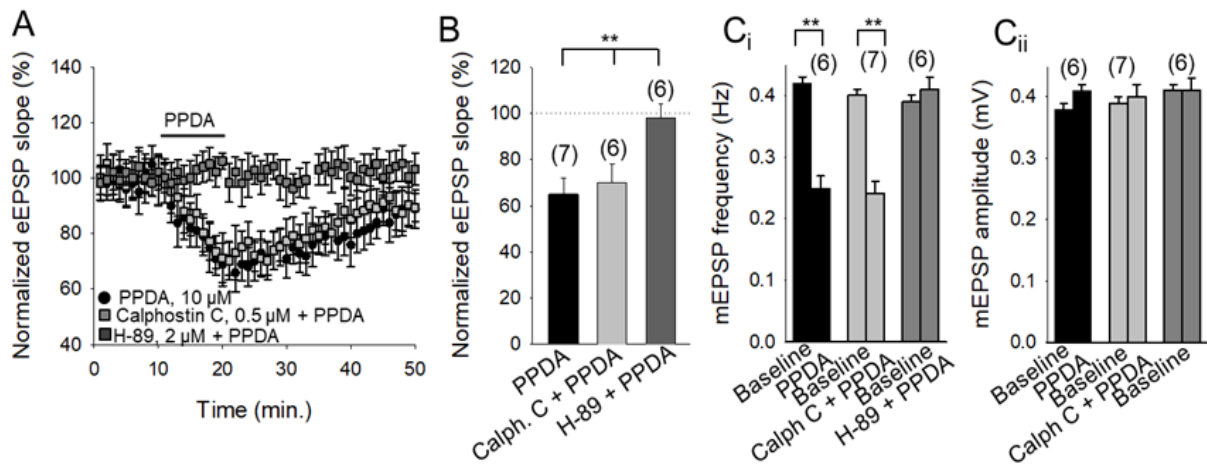


Figura 26: La facilitación de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 involucra la activación de receptores que contienen las subunidad(es) GluN2C/2D y la posterior activación de la PKA. (A) Curso temporal de eEPSP de neuronas a las que se les ha aplicado PPDA 10 μ M durante 10 minutos después de una línea base estable en tres condiciones: sin incubar la rodaja, preincubando la rodaja 1 hora en presencia de calphostin C y preincubando la rodaja 1 hora en presencia de H-89. (B) Resumen de resultados. Los histogramas muestran el valor del eEPSP durante el máximo efecto del PPDA. (Ci, Cii) Efecto sobre mEPSP. Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas se muestra entre paréntesis. ** $p < 0.01$. Test de t de Student.

Estos resultados indican que los receptores presinápticos de tipo NMDA, que contienen las subunidades GluN2B y GluN2C/2D están tónicamente activos y median una facilitación de la liberación de glutamato que requiere de la activación de la PKA en la sinapsis CA3-CA1 de hipocampo.

2. “SPIKE TIMING-DEPENDENT DEPRESSION” PRESINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.

Los receptores presinápticos de tipo NMDA descritos, probablemente participan en *spike timing-dependent long-term depression* (t-LTD) en ratón juvenil (P13-21) en la sinapsis CA3-CA1 de hipocampo, tal y como está descrito en Andrade-Talavera et al. 2016, Fig 27. Se ha observado que este proceso de t-LTD desaparece durante la cuarta semana de desarrollo por lo que se han estudiado los mecanismos celulares y moleculares que median el cierre de esta ventana de plasticidad durante la cuarta semana postnatal, incluyendo la posible función de los receptores presinápticos de NMDA en este proceso.

La *spike timing-dependent plasticity* (STDP) es una forma de plasticidad de larga duración que existe en todas las especies estudiadas desde insectos a humanos y es un fuerte candidato a ser responsable de la remodelación que ocurre en los circuitos sinápticos durante el desarrollo. En la STDP el orden y el tiempo de pareamiento preciso de la actividad presináptica y el potencial de acción postsináptico determinan la dirección y la magnitud del cambio sináptico que se va a producir. Para la t-LTD esto ocurre cuando un potencial de acción postsináptico es seguido por un evento de actividad presináptica (Feldman, 2012).

Los periodos críticos de plasticidad existen durante el desarrollo y son periodos muy intensos donde la plasticidad dependiente de los estímulos sensoriales y la experiencia del entorno tienen un mayor impacto en el desarrollo de los circuitos neuronales. En estas ventanas de plasticidad el reordenamiento y refinamiento de las conexiones neuronales conduce a la formación de los circuitos maduros responsables de la correcta fisiología adulta del cerebro (Hensch, 2004).

Determinar los mecanismos que producen el cierre de estas ventanas de plasticidad durante el desarrollo es importante para estudiar las respuestas del cerebro a distintas experiencias y al daño. Ser capaz de definir estos procesos tiene importantes aplicaciones para la reparación cerebral, la recuperación de la sensibilidad o el tratamiento de desórdenes del neurodesarrollo.

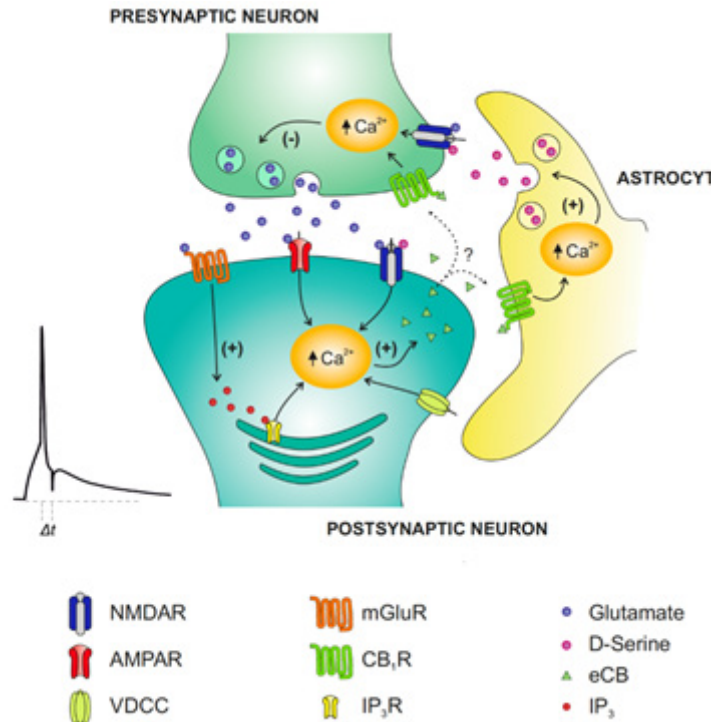


Figura 27: Modelo de t-LTD presináptica en la sinapsis CA3-CA1 de hipocampo de ratón. (A) La t-LTD es inducida por un protocolo de pareamiento de un potencial de acción postsináptico con una estimulación presináptica a baja frecuencia (0.2 Hz). El potencial de acción postsináptico activa los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs) y la liberación presináptica de glutamato activa los receptores mGlu5, que activan a la PLC, produciendo IP3, que causa la liberación de calcio de los reservorios intracelulares, y DAG, que sirve como precursor para la síntesis de eCBs. La señal de los eCBs a través de los receptores CB1, facilita la liberación de D-serina de los astrocitos, que junto con el glutamato liberado presinápticamente, activan los receptores presinápticos de tipo NMDA de las fibras colaterales de Schaffer. Esto aumenta la concentración de calcio presináptico, la activación de la calcineurina y la depresión sináptica. Tomado de Andrade-Talavera et al. 2016.

2.1. El pareamiento repetitivo de actividad presináptica con un potencial de acción postsináptico a baja frecuencia es suficiente para inducir LTD en hipocampo de ratón a P8-21. Esta LTD requiere receptores de tipo NMDA no postsinápticos para su inducción.

Primero, se determinó si el pareamiento de un estímulo presináptico con un único potencial de acción postsináptico a baja frecuencia es suficiente para inducir t-LTD en la sinapsis CA3-CA1. En rodajas preparadas a partir de hipocampo de ratón de edad entre los 8 y 21 días después del nacimiento (P8-21), los EPSPs evocados por estimulación de las SCs en el stratum radiatum fueron monitorizados mediante registros de patch en configuración de célula completa, Fig 28. De acuerdo con lo descrito anteriormente, la t-LTD fue inducida en el modo Current Clamp pareando 100 veces los eEPSPs con un disparo de la célula postsináptica, que ocurre unos 18 ms antes de la estimulación presináptica, cada 5s. Esto induce una robusta t-LTD ($79 \pm 3\%$, $n=7$) mientras que una ruta control no pareada no muestra cambios en la pendiente o amplitud de los eEPSP ($99 \pm 8\%$): Fig 29 A, B.

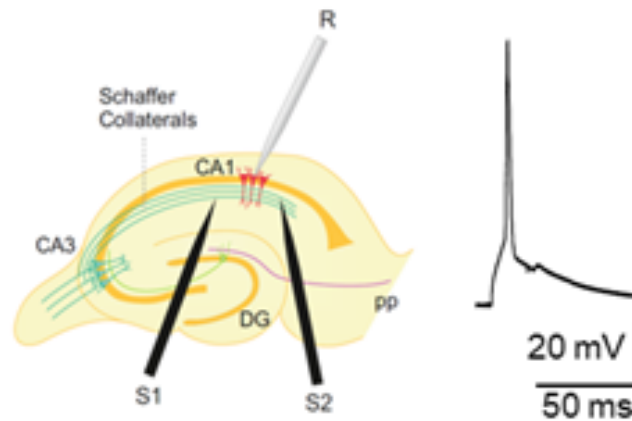


Figura 28: Esquema de la configuración utilizada en los experimentos: *R*, electrodo de registro, *S1* y *S2*, electrodos de estimulación. A la derecha se muestra el protocolo de pareamiento utilizado.

Cuando las rodajas se tratan con el antagonista de los receptores de tipo NMDA, D-AP5, la inducción de esta t-LTD se previene (D-AP5: $108 \pm 6\%$, $n=8$. Control: $74 \pm 8\%$, $n=5$) Fig 29 B, indicando que esta t-LTD requiere de la activación de receptores de tipo NMDA.

Para confirmar que estos receptores de NMDA no son postsinápticos como se ha descrito con anterioridad, se repitió este pareamiento cargando la neurona postsináptica con MK-801 a través de la pipeta de registro. Como se ha reportado previamente para estas sinapsis (Andrade-Talavera et al. 2016), así como para sinapsis neocorticales (Sjöstrom et al. 2003; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al. 2011; Rodríguez-Moreno y Sihra, 2013), el bloqueo de los receptores postsinápticos de NMDA no previene la inducción de la t-LTD (MK-801: $76 \pm 7\%$, $n=9$. Controles: $72 \pm 5\%$, $n=9$) Fig 29 B, mientras que la adición de MK-801 al baño ($500 \mu\text{M}$ ó 1 mM) bloqueó completamente la inducción de la t-LTD, Fig 29 B.

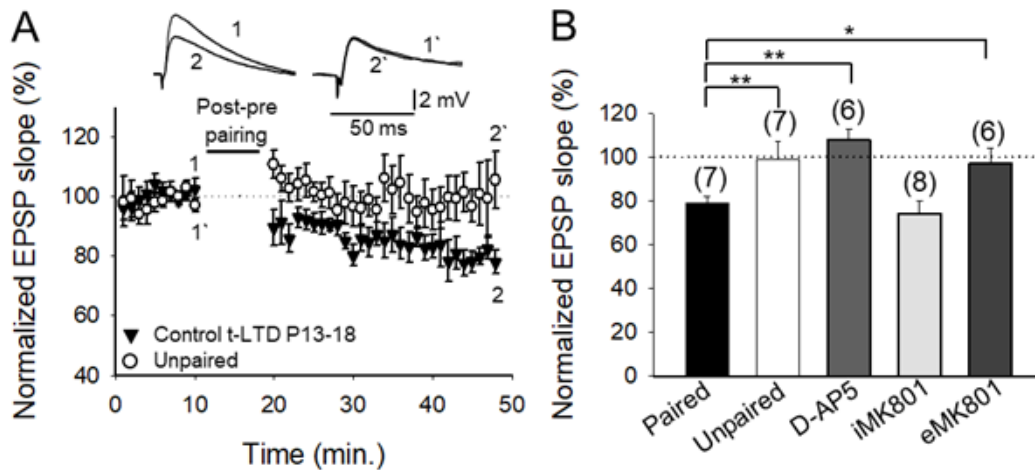


Figura 29: La *slope timing-dependent plasticity* (STDP) está presente a P13-21 y requiere de receptores NMDA no postsinápticos. (A) Cursos temporales de eEPSP. Solo se induce la t-LTD cuando la estimulación presináptica ha sido precedida de un potencial de acción postsináptico. Las trazas muestran el EPSP antes (1) y 30 minutos después del pareamiento (2). La depresión solo se observó en la ruta pareada, y no en la ruta control. (B) Resumen de resultados. Uso de diferentes antagonistas para establecer el papel de los receptores de tipo NMDA en la t-LTD. Cuando se utiliza D-AP5 se previene la inducción de la t-LTD, al igual que cuando se utiliza MK-801 extracelular (eMK801), pero no así cuando este último se carga en la célula postsináptica (iMK801). El error representa el error estándar y el número de rodajas se muestra en paréntesis: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Test t de Student.

Para comprobar que el bloqueo de MK-801 sobre las corrientes de receptores NMDA es completo, se añadió de manera extracelular (eMK-801) a una concentración de 1 mM o se cargó dentro de la célula postsináptica (iMK-801) 1 mM a través de la pipeta de patch. En ambos casos, se produjo un bloqueo total de las corrientes mediadas por receptores de NMDA, Fig 30 A, B.

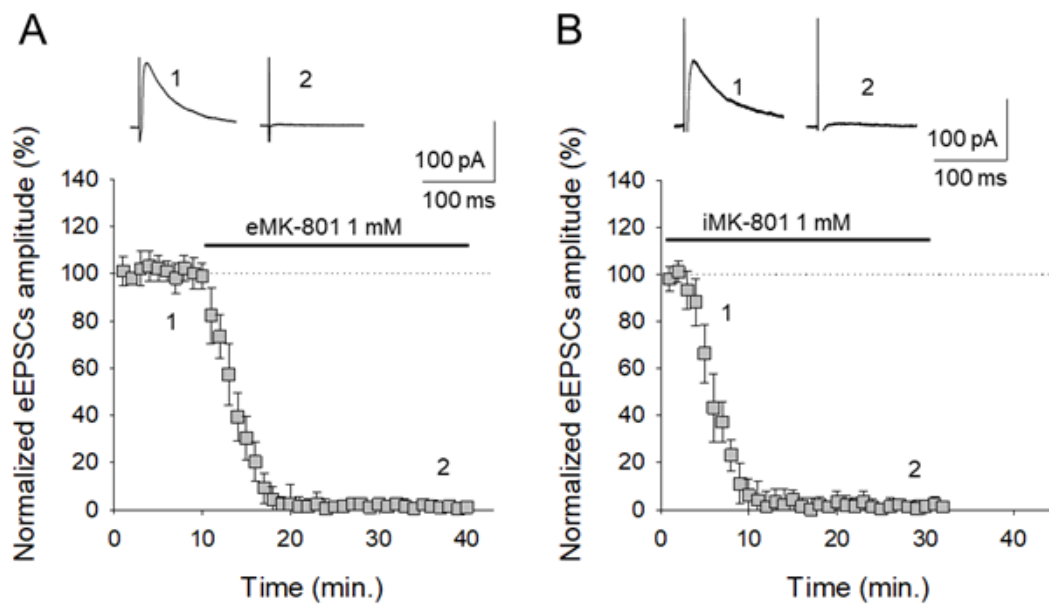


Figura 30: MK-801 añadido de manera extracelular o en el interior de la neurona postsináptica, bloquea completamente las corrientes mediadas por receptores de tipo NMDA. (A) Las corrientes postsinápticas de NMDA fueron monitorizadas durante los experimentos en el modo voltaje-clamp a +40 mV y fue aislada añadiendo bicuculina (10 μ M), potente antagonista de los receptores GABAA, y NBQX (10 μ M), potente antagonista de receptores tipo AMPA, al medio extracelular. Después de registrar una corriente estable de receptores de tipo NMDA durante 10 minutos, MK-801 fue añadido al medio extracelular (eMK-801) y esto produjo una disminución gradual de la amplitud de las corrientes de NMDA, bloqueándolas completamente pasados entre 8 y 10 minutos. (B) Cuando MK-801 se cargó en la neurona postsináptica, se produjo un descenso gradual de las corrientes mediadas por receptores NMDA postsinápticos que comenzaba a observarse pasados 1 o 2 minutos, bloqueando completamente las corrientes de NMDA postsinápticas pasados 8-10 minutos. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1A) o al principio del experimento (1B) y al final de cada experimento (2).

2.2. La t-LTD desaparece durante la cuarta semana de desarrollo.

Se ha estudiado el perfil de desarrollo de esta forma de t-LTD, confirmando como se ha reportado previamente (Andrade-Talavera et al. 2016) que puede ser inducida hasta P21 (P8-14: $72 \pm 6\%$, $n=14$; P13-21: $83 \pm 5\%$, $n=16$) Fig 31 A, B, y desaparece durante de la cuarta semana de desarrollo (P22-30: $106 \pm 7\%$, $n=17$) Fig 31 C. Esto sugiere que esta forma de t-LTD está claramente relacionada a un periodo de desarrollo específico y no es posible inducirla después de manera fisiológica.

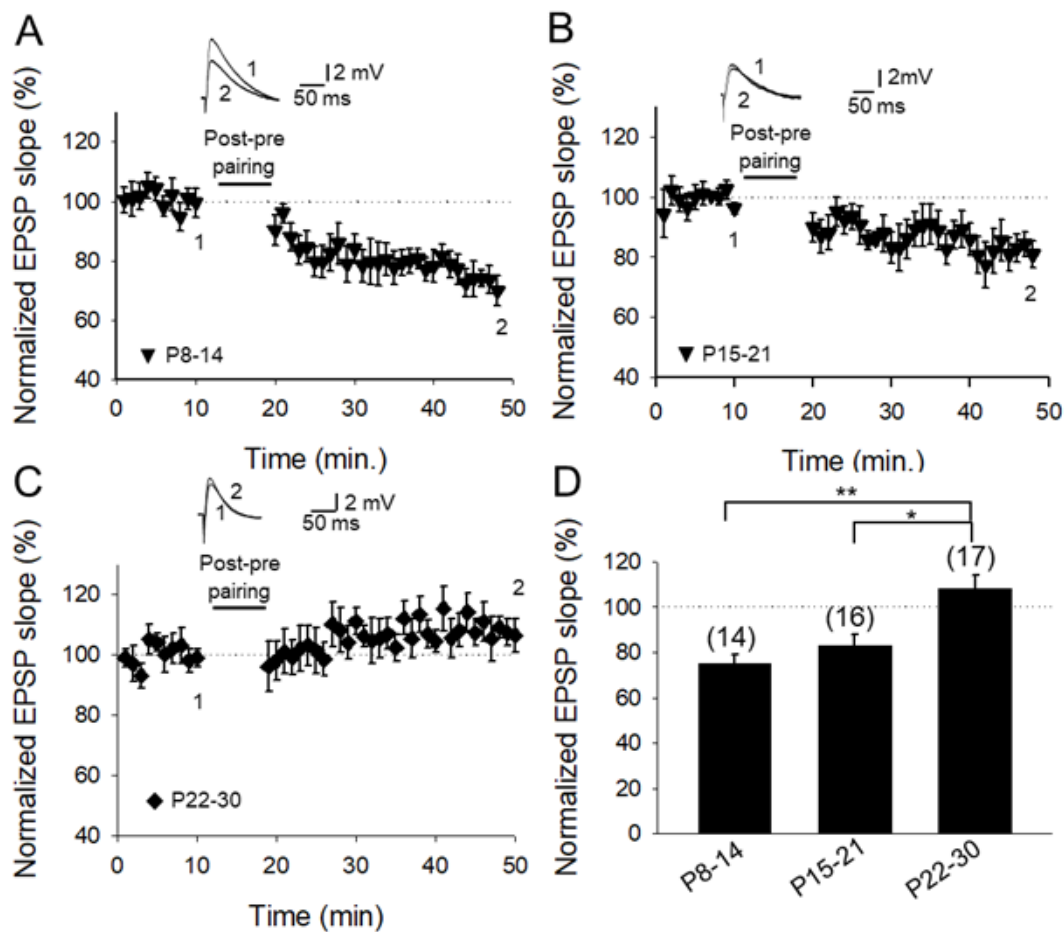


Figura 31: La t-LTD está presente durante las segunda y tercera y desaparece durante la cuarta semana de desarrollo postnatal. La t-LTD es evidente durante la segunda (A) y la tercera (B) semana de desarrollo pero desaparece durante la cuarta semana (C). Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y 30 min después de la aplicación del protocolo de plasticidad. (D) Resumen de resultados, donde el error representa el error estandar y el número de rodajas se muestra en paréntesis: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Test t de Student. En colaboración con Yuniesky Andrade Talavera y Mikel Pérez Rodríguez.

2.3. Los receptores presinápticos de tipo NMDA están tónicamente activos y facilitan la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1 de hipocampo a P13-21 pero no a P22-30.

2.3.1. Los receptores presinápticos de tipo NMDA regulan la liberación evocada (eEPSP) en las sinapsis CA3-CA1 a P13-21 pero no a P22-30.

Las sinapsis muestran una alta probabilidad de liberación de neurotransmisores en las etapas tempranas del desarrollo, que cambia a una baja probabilidad de liberación cuando maduran, como se ha visto en la corteza somatosensorial (Frick et al. 2007), auditiva (Oswald y Reyes, 2008), visual (Cheetham y Fox, 2010) y prefrontal (Gonzalez-Burgos et al. 2008). Los receptores presinápticos de tipo NMDA se cree que están activos en algunas de estas sinapsis durante el desarrollo en la corteza entorrinal (Berreta y Jones, 1996), visual (Larsen et al. 2011) o somatosensorial (Brasier y Feldman, 2008) y se ha visto indirectamente en el hipocampo (Mameli et al. 2005).

Para determinar los mecanismos involucrados en el cierre de esta ventana de plasticidad durante desarrollo, se comprobó si estos receptores de tipo NMDA presinápticos desempeñaban una función en esta forma de plasticidad.

Como se ha visto anteriormente, los receptores preNMDA están modulando la probabilidad de liberación de glutamato a P13-21 pero cuando se repiten estos experimentos (aplicación en el baño de D-AP5 con la neurona postsináptica cargada con 1 mM de MK-801) a P22-30, D-AP5 no afecta a la pendiente de eEPSP (P13-21: $80\pm3\%$, P22-30: $101\pm7\%$, $n=8$) Fig 32 A, B o su PPR (P13-21: línea base: 1.6 ± 0.08 , D-AP5: 2.0 ± 0.1 , $n=6$. P22-30: línea base: 1.6 ± 0.1 , D-AP5: 166 ± 0.13), indicando que la activación tónica de los receptores de NMDA que modulan la liberación de glutamato se pierde a medida que el desarrollo avanza.

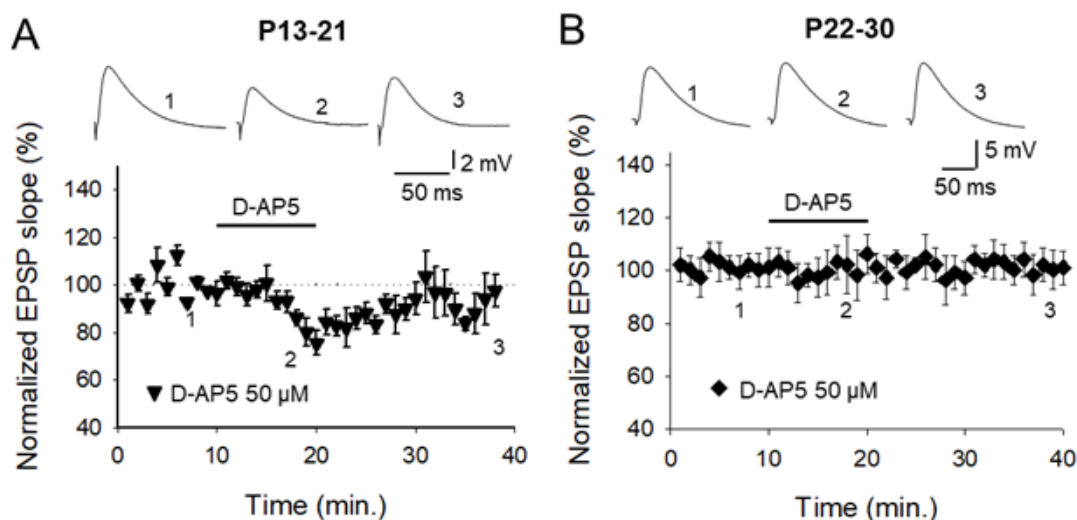


Figura 32: Los receptores presinápticos de tipo NMDA están tónicamente activos en la sinapsis CA3-CA1 a P13-21 pero no a P22-30. (A) Con la neurona postsináptica cargada con MK-801, la adición de D-AP5 disminuye la pendiente de los eEPSP, un efecto que fue revertido tras el lavado de esta sustancia a P13-21. (B) A P22-30, D-AP5 no tiene efecto sobre el eEPSP. Los trazos muestran los EPSP a las dos edades durante la línea base (1), en presencia de D-AP5 (2) tras el lavado de D-AP5 (3). En colaboración con Mikel Pérez Rodríguez.

2.3.2. Los receptores presinápticos de tipo NMDA regulan la actividad miniatura (mEPSP) a P13-21 pero no a P22-30.

Como se ha demostrado anteriormente, a P13-21 los preNMDA de la sinapsis CA3-CA1 controlan la liberación espontánea de glutamato (mEPSP), disminuyendo la frecuencia de mEPSPs (línea base: 0.37 ± 0.05 Hz, $n=6$; D-AP5 0.22 ± 0.05 Hz, $n=6$), pero sin modificar su amplitud, Fig 33.

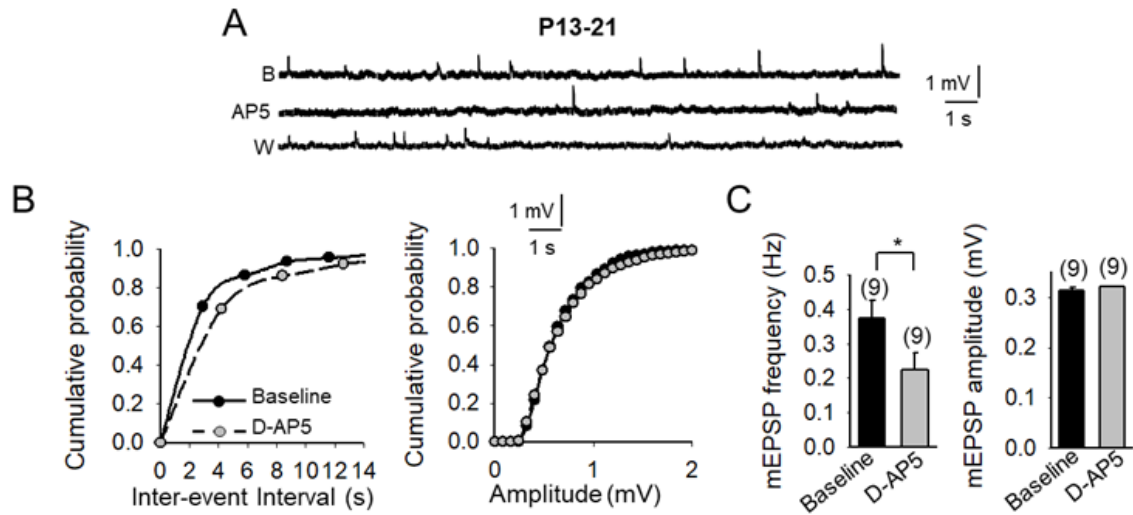


Figura 33: Actividad miniatura (mEPSP) a P13-21. (A) Trazos de la actividad espontánea miniatura a P13-21 durante la línea base (B), la aplicación de D-AP5 (AP5) y tras el lavado de D-AP5 (W). (B) Histogramas de probabilidad acumulada que muestran que D-AP5 afecta a la frecuencia, pero no a la amplitud de los mEPSPs. (C) Histogramas donde se muestra mEPSP durante la línea base y durante la aplicación de D-AP5. Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas se muestra en paréntesis. * $p < 0.05$. Test de t de Student.

Cuando se repiten los experimentos a P22-30, se observó que D-AP5 no tiene efecto sobre frecuencia (Línea base: 0.4 ± 0.04 , D-AP5: 0.43 ± 0.05 , $n=7$) de los mEPSPs o sobre su amplitud (Línea base: 0.35 ± 0.01 mV, D-AP5: 0.37 ± 0.02 , $n=7$) Fig 34.

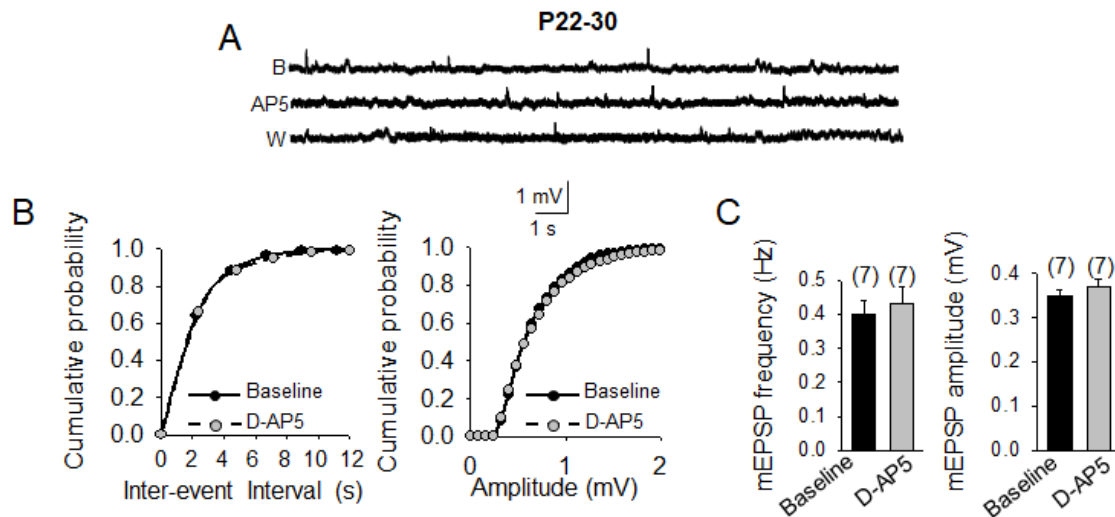


Figura 34: Actividad miniatura (mEPSP) a P22-30. (A) Trazos de mEPSP a P22-30 durante la línea base (B) la aplicación de D-AP5 (AP5) tras el lavado de D-AP5 (W). (B) Histogramas de probabilidad acumulada que muestran que D-AP5 no afecta a la frecuencia ni a la amplitud de mEPSP. (C) Histogramas donde se muestra la actividad espontánea durante la línea base y durante la aplicación de D-AP5, no se observan diferencias significativas. Las barras de error indican el error estándar y el número de rodajas se muestra en paréntesis.

2.4 Los transportadores de glutamato no están involucrados en la pérdida de la t-LTD con la maduración.

La presencia (P13-21) o ausencia (P22-30) de la activación tónica de estos preNMDAR y su participación en la inducción de la t-LTD no es debida a cambios en la actividad de los transportadores de glutamato con la maduración, ya que no hay diferencias en los parámetros registrados en presencia del bloqueador de transportadores de glutamato TBOA (50 μ M) a P13-21 o P22-30. Una robusta t-LTD se observa en presencia de TBOA a P13-21 ($70\pm6\%$, $n=6$) y no se observa en P22-30 (110 ± 15 , $n=6$), Fig 35 A, B.

De esta manera, la t-LTD parece depender directamente de la activación tónica de estos preNMDARs y podría ser debida a cambios en la liberación de glutamato afectados por la concentración extracelular de Ca^{2+} . De hecho, la t-LTD no puede ser inducida a P13-21 cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular disminuye a 1 mM ($107\pm8\%$, $n=6$) mientras que la t-LTD a P22-30 puede ser rescatada ($79\pm6\%$, $n=6$) cuando la concentración de calcio extracelular es incrementada a 4 mM, Fig 35 C, D.

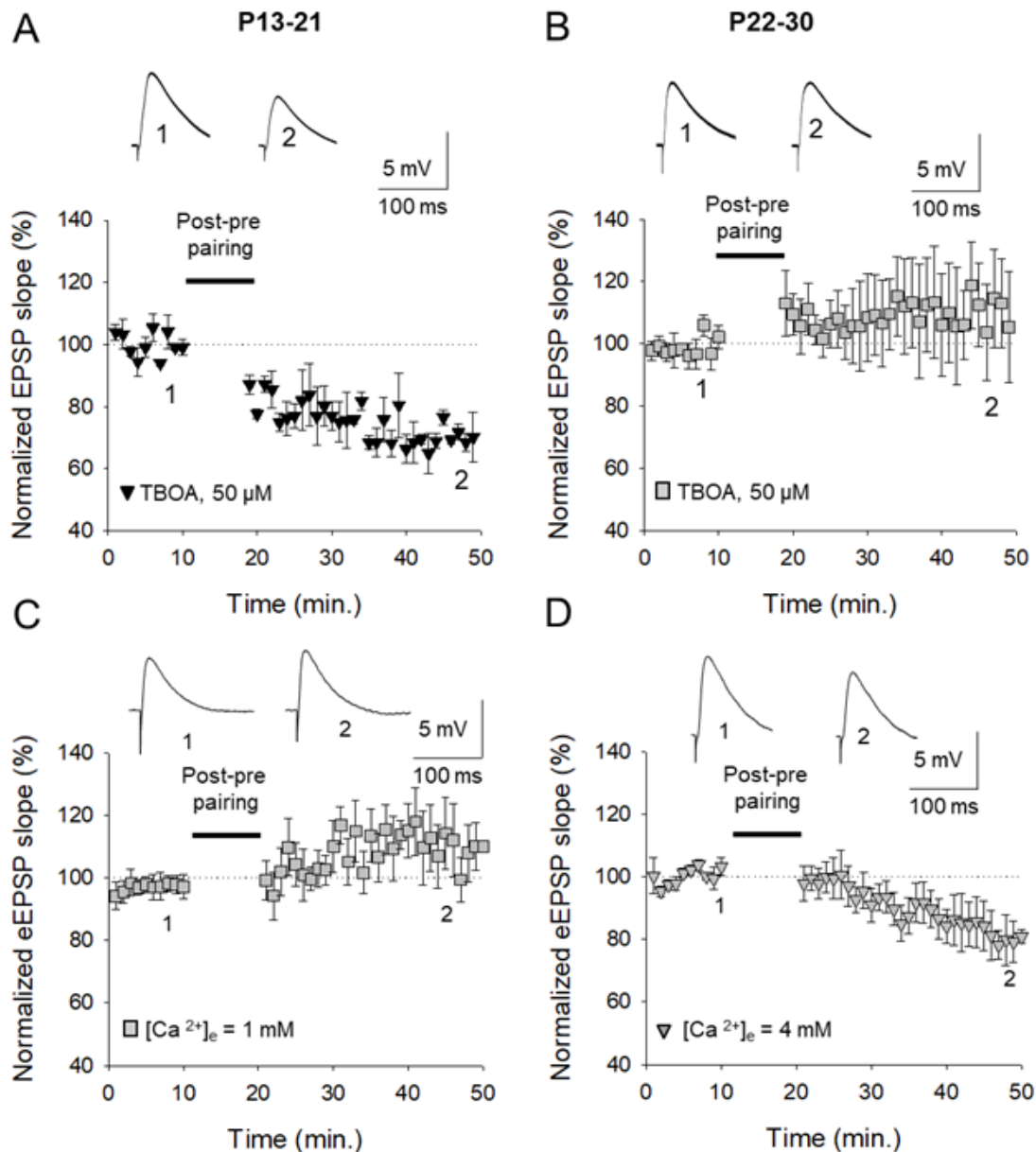


Figura 35: Los transportadores de glutamato no están involucrados en la pérdida de la t-LTD con la maduración. La presencia (A) o ausencia (B) de la activación tónica de los preNMDAR no está mediada por un cambio en los transportadores de glutamato con la maduración, ya que los resultados obtenidos a P13-21 y P22-30 en presencia del bloqueador del transportador de glutamato TBOA (50 μ M) son muy similares a los obtenidos en experimentos control. (C, D) La t-LTD está directamente vinculada a la activación tónica de los receptores presinápticos de NMDA por glutamato, y cambiar esta probabilidad de liberación se afecta directamente a la t-LTD. Cuando la concentración de calcio extracelular se disminuye a 1 mM, la t-LTD no puede ser inducida a P13-21 (C) mientras que la t-LTD puede ser rescatada a P22-30 (cuando normalmente está ausente) si la concentración de calcio es incrementada a 4 mM (D). Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y al final de cada experimento (2).

3. t-LTP PRESINÁPTICA EN RATONES DE 35 A 42 DÍAS POSTNATALES (P35-42).

Curiosamente, durante la quinta semana de desarrollo, se observa un cambio o “switch” en la *spike timing-dependent long-term plasticity* y aparece una forma de *spike timing-dependent long-term potentiation* (t-LTP) al aplicar el mismo protocolo de pareamiento a baja frecuencia con el que se induce una t-LTD en el ratón joven P13-21, como se ha descrito con anterioridad. En esta parte de la memoria se describe la caracterización efectuada de los mecanismos celulares y moleculares de esta nueva forma de t-LTP descubierta.

Las respuestas evocadas por estimulación de las colaterales de Schaffer en el *stratum radiatum* del hipocampo se obtuvieron en registros de neuronas de la región CA1 de ratones entre los días postnatal 35 y postnatal 42 (P35-42) utilizando la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa. De acuerdo con lo descrito previamente, la t-LTP se produjo en la célula bajo registro pareando durante 100 pulsos un potencial de acción postsináptico con una posterior estimulación presináptica (protocolo post-pre, timing 18ms) a baja frecuencia (0.2 Hz), Fig 28. Esto indujo una robusta t-LTP ($142 \pm 10\%$, $n=10$) Fig 36 A, en la ruta donde se produce el pareamiento. Para comprobar el origen pre o postsináptico de esta t-LTP, se analizaron la facilitación por pares de pulsos (línea base: 2.02 ± 0.18 vs t-LTP: $1.22 \pm 0.08\%$, $n=17$) y la probabilidad de fallos en la transmisión sináptica (línea base: $5.4 \pm 0.68\%$ vs t-LTP: $1.2 \pm 0.58\%$, $n=8$) que indican que la expresión de esta forma de t-LTP es presináptica, Fig 36 B, C.

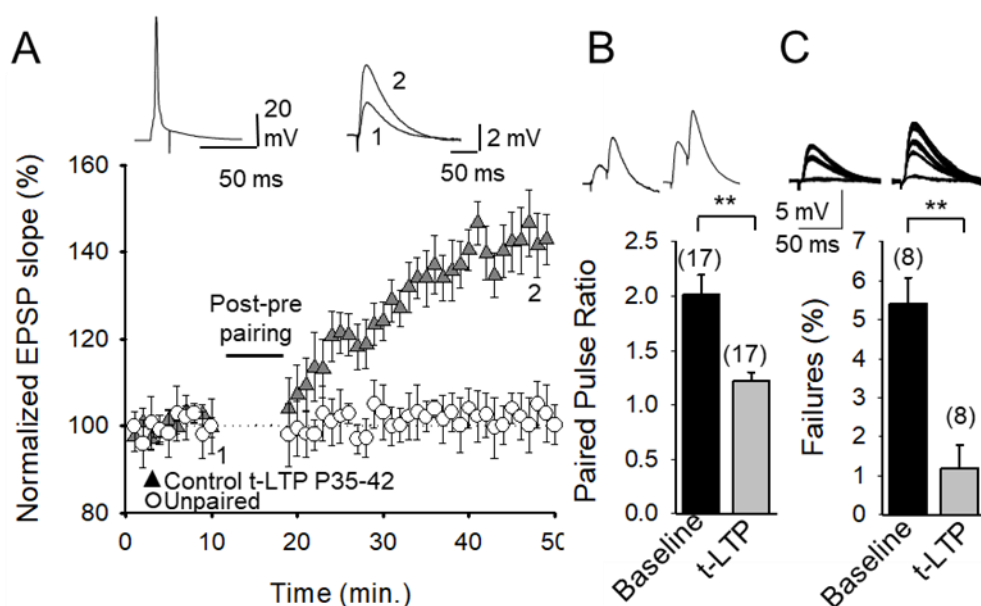


Figura 36: A P35-42 aparece una nueva forma de *spike timing-dependent long-term potentiation* (t-LTP) de expresión presináptica. (A) El curso temporal de EPSP se monitorizó durante 10 minutos de línea base estable, luego se indujo el pareamiento y los eEPSP fueron monitorizados al menos durante otros 30 minutos después de aplicar el protocolo de plasticidad. Los trazos pertenecen al protocolo utilizado y al eEPSP durante la línea base (1) y 30 minutos después de aplicar el protocolo de plasticidad (2). (B) Análisis de pares de pulsos. Después de t-LTP se produce una disminución del ratio por pares de pulsos, lo que indica un efecto presináptico. (C) Estudio del número de fallos al provocar los eEPSP. Después de t-LTP hay un menor número de fallos de liberación, lo que indica un efecto presináptico. La t-LTP se produce solo en la ruta donde se produce el pareamiento. $**p < 0.01$, Test de t de Student. En colaboración con Yuniesky Andrade Talavera.

3.1 Papel de los receptores de tipo NMDA en la t-LTP observada a P35-42.

Como se ha visto anteriormente, los receptores de tipo NMDA participan en la inducción de la t-LTD a P8-21. Para determinar si intervienen en la inducción de la t-LTP. Se determinó si ocurre en presencia de los antagonistas D-AP5 (50 μ M) y MK-801 (1 mM). En estas condiciones la t-LTP no se ve alterada (Control: $153 \pm 12\%$, $n=7$. D-AP5: $144 \pm 7\%$, $n=6$. MK-801: $148 \pm 5\%$, $n=6$). Fig 37.

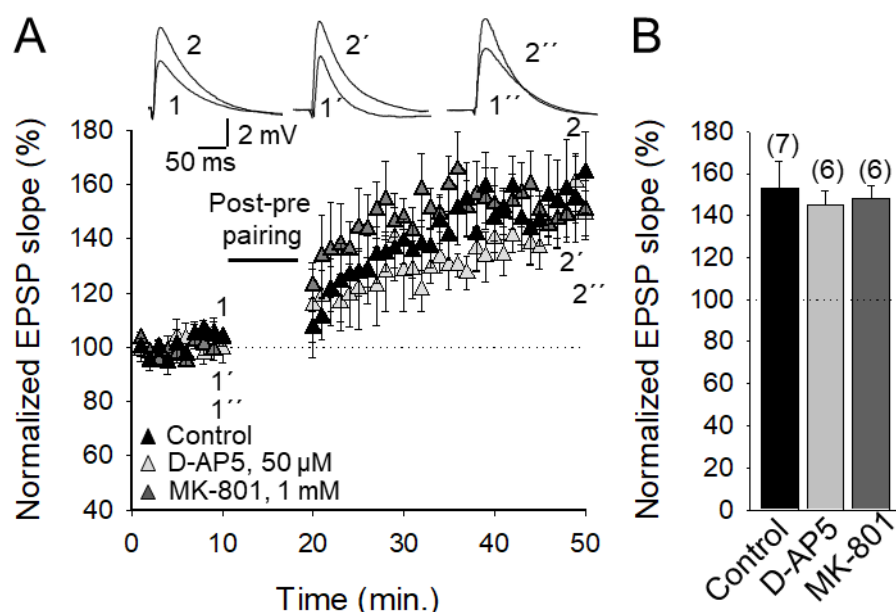


Figura 37: Los receptores de tipo NMDA no participan en la inducción de la t-LTP. (A) *Cursos temporales de los eEPSP en experimento control y en presencia de D-AP5 o MK-801. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y 30 minutos después de la aplicación del protocolo de plasticidad (2).* (B) *Resumen de resultados. No hay diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales estudiadas. En colaboración con Mikel Pérez Rodríguez.*

Seguidamente, se determinó si los receptores metabotrópicos de glutamato, que han sido ampliamente involucrados en procesos de plasticidad sináptica además de los receptores de tipo NMDA, participan en esta forma de LTP. Primero, se realizaron experimentos en presencia de LY341495, que previno la inducción de t-LTP (Control: 153 ± 12 , $n=6$. LY341495: 106 ± 12 , $n=6$), Fig 38. Los receptores mGluR I han sido previamente relacionados con la plasticidad sináptica. Para determinar si los receptores de este grupo están involucrados, se repitieron los experimentos en presencia de los antagonistas de mGluR del grupo I, LY367385 y MPEP. La aplicación al baño de LY367385, antagonista de mGlu1, no modifica la inducción t-LTP (Control: 153 ± 12 , $n=6$. LY367385: 132 ± 13 , $n=6$) Fig 38 B. La aplicación de MPEP, antagonista de receptores mGlu5, al baño previno la inducción de t-LTP (Control: 153 ± 12 , $n=6$. MPEP: 79 ± 11 , $n=7$), Fig 38.

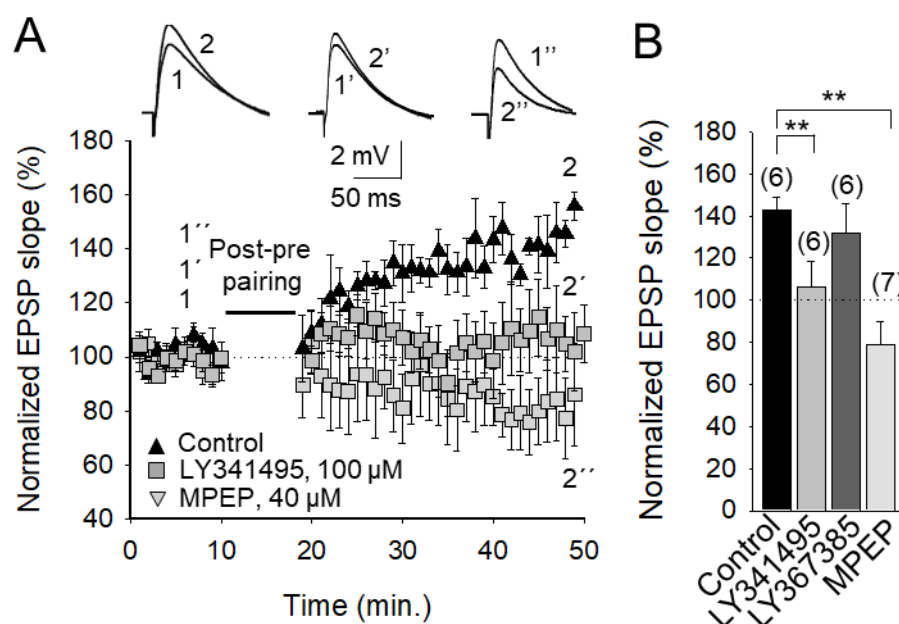


Figura 38: Los receptores de tipo NMDA no participan en la inducción de la t-LTP. (A) *Cursos temporales de los eEPSP en experimento control y en presencia de D-AP5 o MK-801. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y 30 minutos después de la aplicación del protocolo de plasticidad (2).* (B) *Resumen de resultados. No hay diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales estudiadas. En colaboración con Mikel Pérez Rodríguez.*

Por último, para avanzar en el conocimiento de la posible localización (presináptica, postsináptica o glial) de estos receptores metabotrópicos de glutamato involucrados en la inducción de la t-LTP presináptica se repitieron los experimentos tratando con GDP β S (que impide el correcto funcionamiento de proteínas G) la neurona postsináptica o los astrocitos cercanos a la sinapsis estudiada. Cuando se encuentra dentro de la neurona postsináptica (p-GDP β S) (164 ± 21 , $n=6$) o los astrocitos (a-GDP β S) (147 ± 10 , $n=6$) la t-LTP permanece inalterada respecto al control (153 ± 12 , $n=6$), Fig 39. Estos experimentos indican que los receptores metabotrópicos de glutamato que se requieren para la inducción de la misma no son postsinápticos ni están situados en los astrocitos cercanos a la sinapsis de estudio, sugiriendo que son probablemente presinápticos.

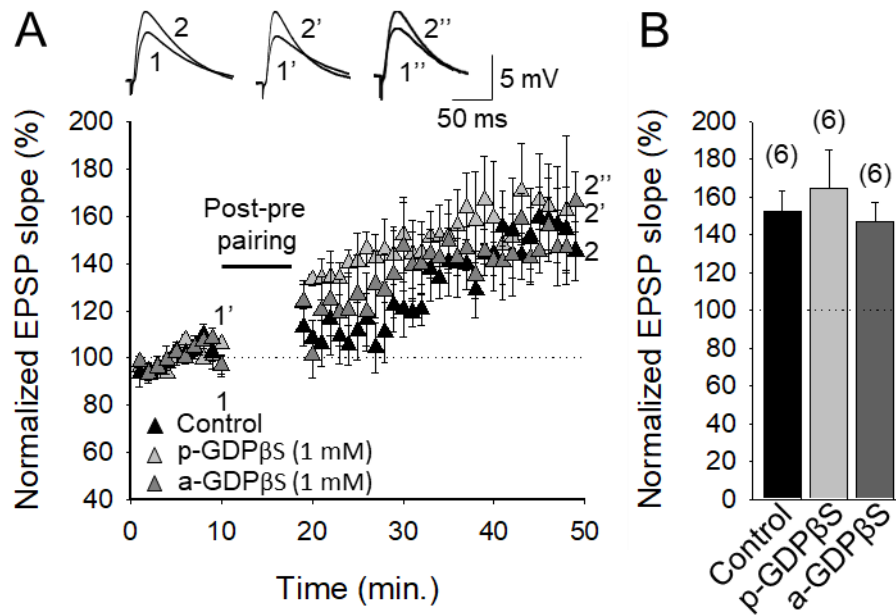


Figura 39: La t-LTP no es afectada cuando se altera el funcionamiento de proteínas G de las neuronas postsinápticas o de los astrocitos. (A) Cursos temporales de los eEPSP en el experimento control y cuando la neurona postsináptica o el astrocito están cargados de GDPβS. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y al final de cada experimento (2). (B) Resumen de resultados. No hay diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales estudiadas. En colaboración con Mikel Pérez Rodríguez.

3.2 La t-LTP requiere de calcio citoplasmático en la célula postsináptica.

Para determinar si la neurona postsináptica es necesaria para la inducción de esta t-LTP presináptica, se determinó la necesidad de un aumento en la concentración de calcio intracelular de manera postsináptica. Se obtuvieron registros de respuestas evocadas con diferentes sustancias que afectan a la dinámica del calcio.

Primero, la neurona postsináptica se llenó con BAPTA 20 mM, un quelante de calcio. En esta situación se previene la t-LTP (Control: 152 ± 11 , $n=10$. BAPTA: 88 ± 4 , $n=6$). De forma similar, cuando se aplica tapsigargina 10 μ M, que impide la liberación de calcio de reservorios intracelulares, (Control: 152 ± 11 , $n=10$. Tapsigargina: $93 \pm 11\%$, $n=6$), o nimodipina 1 mM, que evita la entrada de calcio desde el medio extracelular a través de canales de calcio de tipo L la t-LTP no puede ser inducida, (Control: 152 ± 11 , $n=10$. Nimodipina: $104 \pm 8\%$, $n=6$), Fig 40.

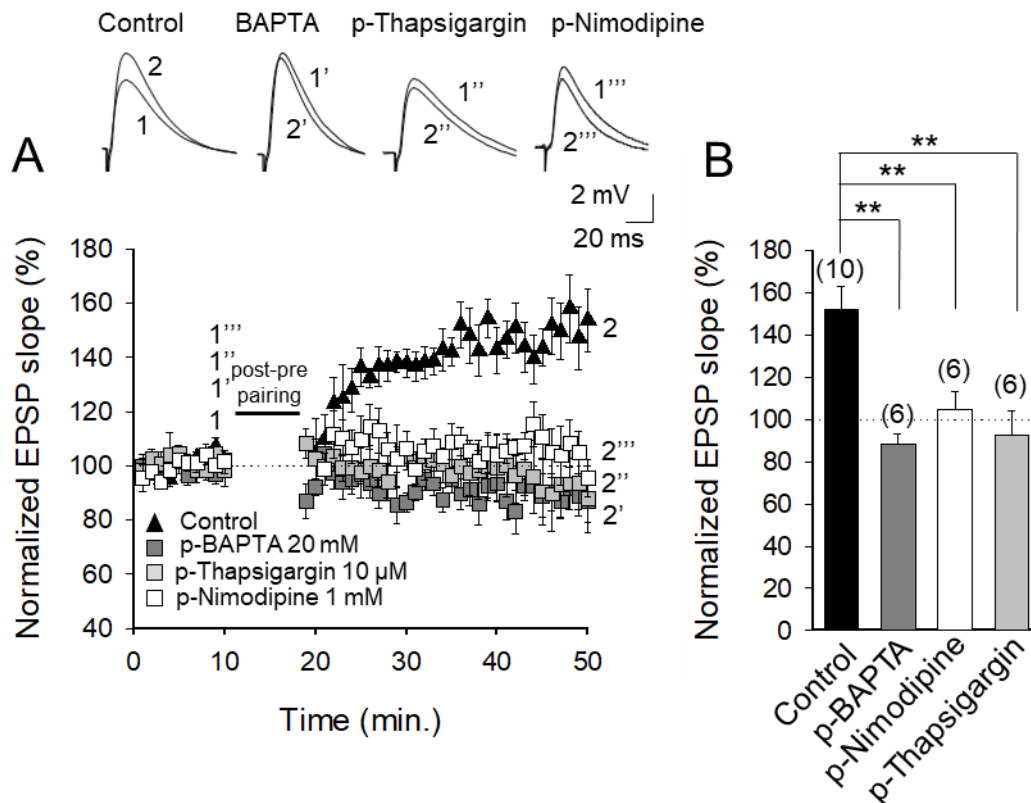


Figura 40: Un aumento de calcio en el interior de la célula postsináptica es necesario para la inducción de t-LTP. (A) El tratamiento de la neurona postsináptica con BAPTA, thapsigargina o nimodipina previene la inducción de t-LTP. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) 30 minutos después de la aplicación del protocolo de plasticidad (2). (B) Resumen de resultados. El error representa el error estándar y el número de rodajas se expresa entre paréntesis. ** $p < 0.01$, Test de t de Student.

3.3 La neurona postsináptica produce NO.

Para determinar qué molécula de señalización es producida por la célula postsináptica durante la inducción de esta t-LTP, se estudió la necesidad del sistema de señalización cannabinoide para la inducción de la t-LTP a P35-42, dado su conocido papel en t-LTD a P13-21 (Andrade-Talavera et al. 2016).

La aplicación de un antagonista de los receptores cannabinoides de tipo 1 (CB_1), AM-251 ($3\mu M$), no tiene efecto sobre la inducción de t-LTP (control: $151 \pm 10\%$, $n=12$ vs AM-251 $140 \pm 17\%$, $n=5$) Fig 41. De manera similar, cuando la neurona postsináptica se carga con THL $5\mu M$, un inhibidor de la enzima diacilglicerol lipasa encargada de la síntesis de eCBs, la t-LTP permanece inalterada (Control: $151 \pm 10\%$, $n=12$. THL: $154 \pm 8\%$, $n=6$), Fig 41 B. Por último, la aplicación de un agonista de receptores CB_1 como el 2-AG ($5\mu M$), cuando la actividad de la neurona postsináptica fue bloqueada por BAPTA 20 mM cargado a través de la pipeta de patch, no es capaz de recuperar la t-LTP (Control: $151 \pm 10\%$, $n=12$. p-BAPTA+2-AG: $95 \pm 6\%$, $n=10$), Fig 41. Estos resultados indican que el sistema de señalización de receptores cannabinoides CB_1 no es necesario para la inducción de esta forma de LTP.

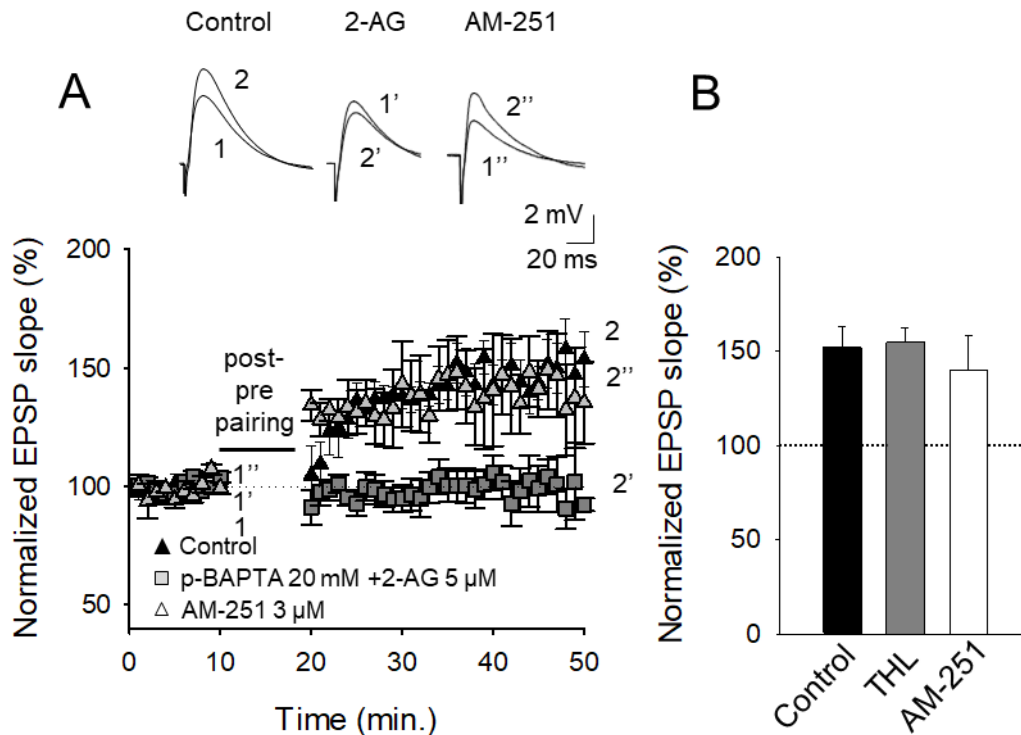


Figura 41: El sistema cannabinoide no participa en la inducción de t-LTP. (A) La t-LTP no se ve afectada por el efecto THL 5 (μM) y AM-251 3 (μM) ni se induce por un agonista (2-AG 5 μM) tras bloquear la actividad de la neurona postsináptica con BAPTA 20 mM. Los trazos muestran los eEPSP durante la línea base (1) y 30 minutos después de la aplicación del protocolo de plasticidad (2). (B) Resumen de resultados. El error representa el error estándar y el número de rodajas se expresa entre paréntesis. En colaboración con Yuniesky Andrade Talavera.

Para determinar qué molécula de la neurona postsináptica podría estar participando en esta forma de LTP y dado que el óxido nítrico (NO) ha sido involucrado en algunas formas de plasticidad se realizaron experimentos para determinar si este compuesto es necesario para la inducción de t-LTP (Padamsey et al. 2017).

Para ello, se realizaron experimentos añadiendo Carboxy-PTIO (cPTIO) 5 mM, una molécula que reacciona con NO y lo retira del medio (scavenger), a la neurona postsináptica a través de la pipeta de patch. Se observó que su aplicación abole completamente la inducción de t-LTP (Control: 144 ± 8 vs p-cPTIO: $105 \pm 4\%$, $n=6$). Para confirmar este mecanismo, se trató la neurona postsináptica con L-NAME 100 μM , un inhibidor de la óxido nítrico sintasa. En estas condiciones, también se previene la inducción de t-LTP (Control: 144 ± 8 vs p-L-NAME: $104 \pm 2\%$, $n=6$) Fig. 42. Estos resultados indican que la inducción de t-LTP requiere de la generación y probablemente la liberación al medio extracelular de NO por parte de la célula postsináptica.

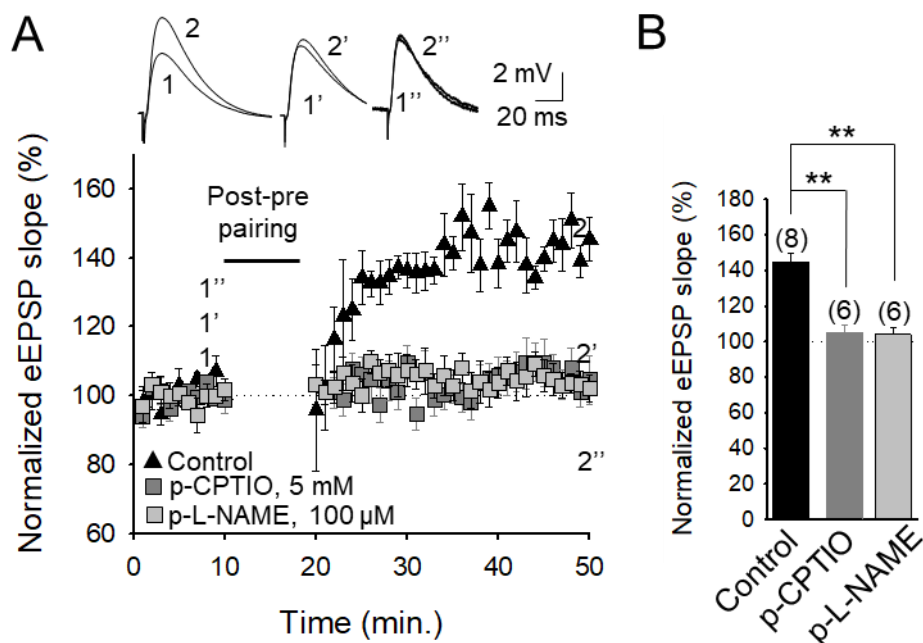


Figura 42: La inducción de t-LTP requiere de óxido nítrico (NO) procedente de la célula postsináptica.

(A) Cuando la neurona postsináptica se trata con *cPTIO* o *L-NAME* no es posible la inducción de la t-LTP. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y 30 minutos después de la aplicación del protocolo de plasticidad (2). (B) Resumen de resultados. El error representa el error estándar y el número de rodajas se expresa entre paréntesis. $**p < 0.01$, Test de *t* de Student. En colaboración con Pedro Mateos Aparicio Moreno.

3.4 La inducción de t-LTP requiere de la liberación vesicular de los astrocitos.

Para determinar si la actividad de los astrocitos es necesaria para la inducción de t-LTP, se realizaron varias aproximaciones experimentales. Primero, se preincubaron las rodajas durante una hora en presencia de la gliotoxina fluoracetato (10 mM). En esta situación se abolió completamente la inducción de t-LTP (Control: 143.5 ± 9 , $n=6$. Fluoracetato: $107 \pm 16\%$, $n=6$), Fig 43 C. Segundo, se cargó el astrocito con una concentración 20 mM de BAPTA. En estas condiciones también se previno la inducción de t-LTP (Control: 143.5 ± 9 , $n=6$. a-BAPTA: $112 \pm 7\%$, $n=7$) Fig 43 B, C. Por último, para confirmar la necesidad de los astrocitos en la inducción de t-LTP se utilizaron ratones mutantes dnSNARE, cuya modificación genética impide la liberación vesicular por parte de los astrocitos astrocito cuando esta se encuentra activa (ver introducción, parte 4.3). En este modelo, cuando la liberación vesicular de los astrocitos está impedida, no es posible la inducir t-LTP (Control: 143.5 ± 9 , $n=6$. dnSNARE: $94 \pm 6\%$, $n=7$) Fig. 43 B, C. Estos resultados indican que para la inducción de t-LTP es necesaria la liberación vesicular de algún gliotransmisor por parte de los astrocitos.

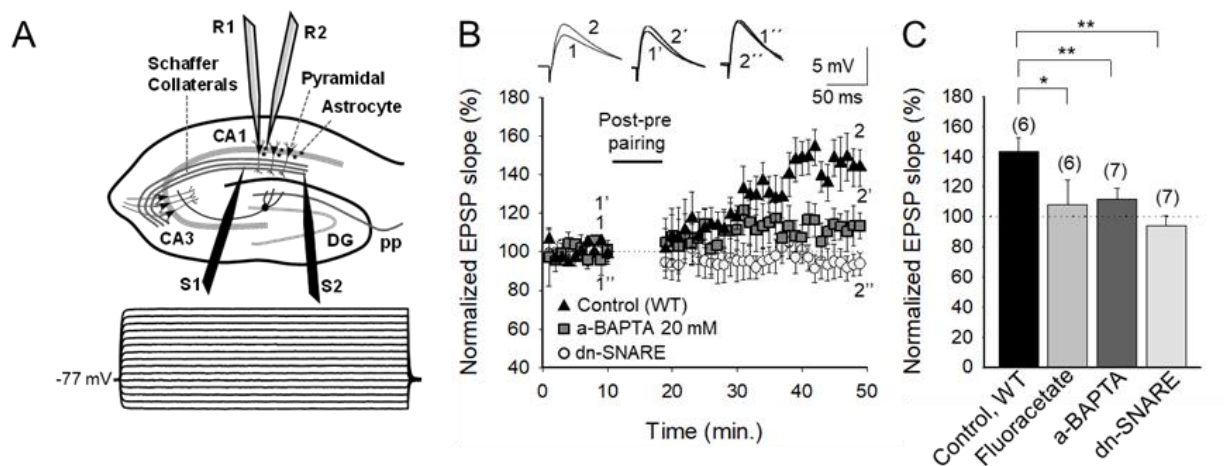


Figura 43: La inducción de t-LTP depende de la liberación vesicular de gliotransmisor por parte de los astrocitos. (A) Esquema general de la configuración de los experimentos; R1 y R2, electrodos de registro; S1 y S2, electrodos de estimulación, abajo se muestran las trazas características del astrocito ante un “step protocol”. (B) Cursos temporales de eEPSP en control, con BAPTA 20 mM en el astrocito (a-BAPTA) y utilizando el ratón mutante dnSNARE. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y 30 minutos después de la aplicación del protocolo de plasticidad (2). (C) Resumen de resultados. El error representa el error estándar y el número de rodajas se manifiesta en paréntesis: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Test de *t* de Student. En colaboración con Mikel Pérez Rodríguez.

3.5 Los astrocitos son estimulados por el NO liberado por la neurona postsináptica.

Para averiguar la posible diana del NO liberado por la neurona postsináptica, se repitieron los experimentos con cPTIO en los astrocitos. Primero, cuando se tratan los astrocitos cercanos a las sinapsis estudiadas con cPTIO 5 mM, se previene la inducción de t-LTP (Control: 143 ± 9 , $n=6$. a-cPTIO: $95 \pm 3\%$, $n=7$) Fig 44, lo que sugiere que el astrocito es capaz de detectar el aumento de la concentración de NO y este NO es capaz de estimular a los astrocitos produciendo la liberación de algún gliotransmisor. Segundo, se cargaron los astrocitos con L-NAME 100 μ M, y en esta ocasión, la t-LTP permaneció inalterada (Control: $143 \pm 9\%$, $n=6$. a-L-NAME: $133 \pm 2\%$, $n=6$) Fig 44. Estos datos sugieren que el astrocito es capaz de reaccionar a variaciones en la concentración de NO pero no genera más NO en respuesta a esta estimulación.

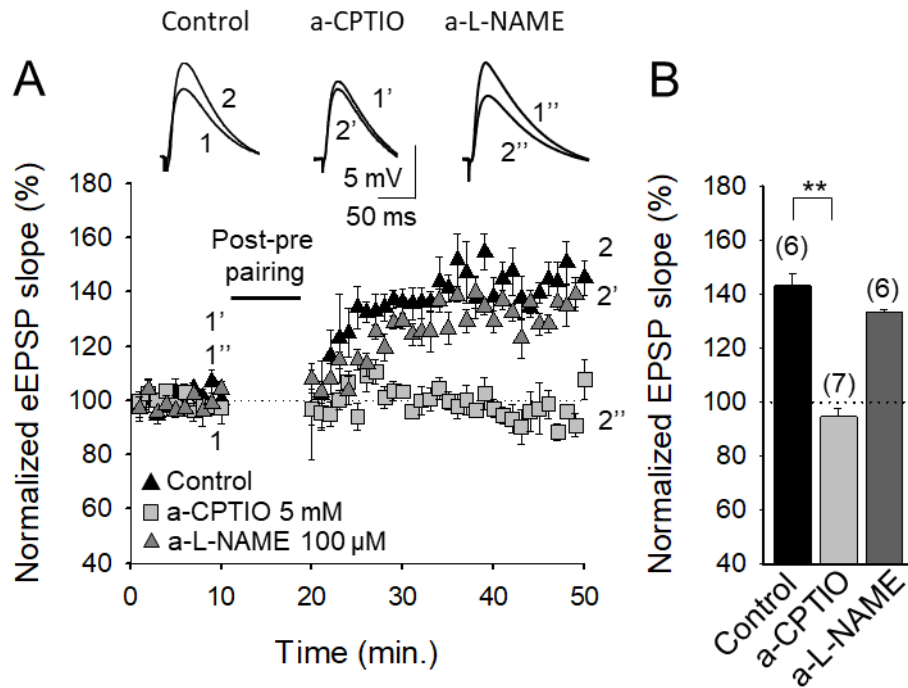


Figura 44: La t-LTP requiere de un aumento en los niveles de NO en los astrocitos. (A) *Cursos temporales de eEPSP cuando los astrocitos están cargados con cPTIO o L-NAME. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y 30 minutos después de aplicar el protocolo de plasticidad (2).* (B) *Resumen de resultados. El error representa el error estándar y el número de rodajas se expresa entre paréntesis. ** $p < 0.01$, Test de t de Student. En colaboración con Pedro Mateos Aparicio Moreno.*

3.6 La t-LTP requiere de la activación de la PKC de los astrocitos.

Para determinar si la activación de la PKC de los astrocitos es necesaria para la inducción de la t-LTP, se repitieron los experimentos en presencia de calfostin C (1 μM). Primero se aplicó en el baño y se realizó el protocolo de pareamiento para inducir la t-LTP, y en este caso, se produjo una t-LTD (Control: 130 ± 5 , $n=10$. Calfostin C: $53 \pm 6\%$, $n=6$). Después, se llenó con calfostin C en la neurona postsináptica a través de la pipeta de patch, y en este caso no se afectó la inducción de t-LTP (Control: 130 ± 5 , $n=10$. p-Calfostin C: $131 \pm 6\%$, $n=6$). Seguidamente, cuando se trató el astrocito con calfostin C, se previno la inducción de t-LTP (Control: $130 \pm 5\%$, $n=10$. a-Calfostin C: $97 \pm 10\%$, $n=6$), lo que indica que la PKC del astrocito participa en la inducción de t-LTP, Fig 45.

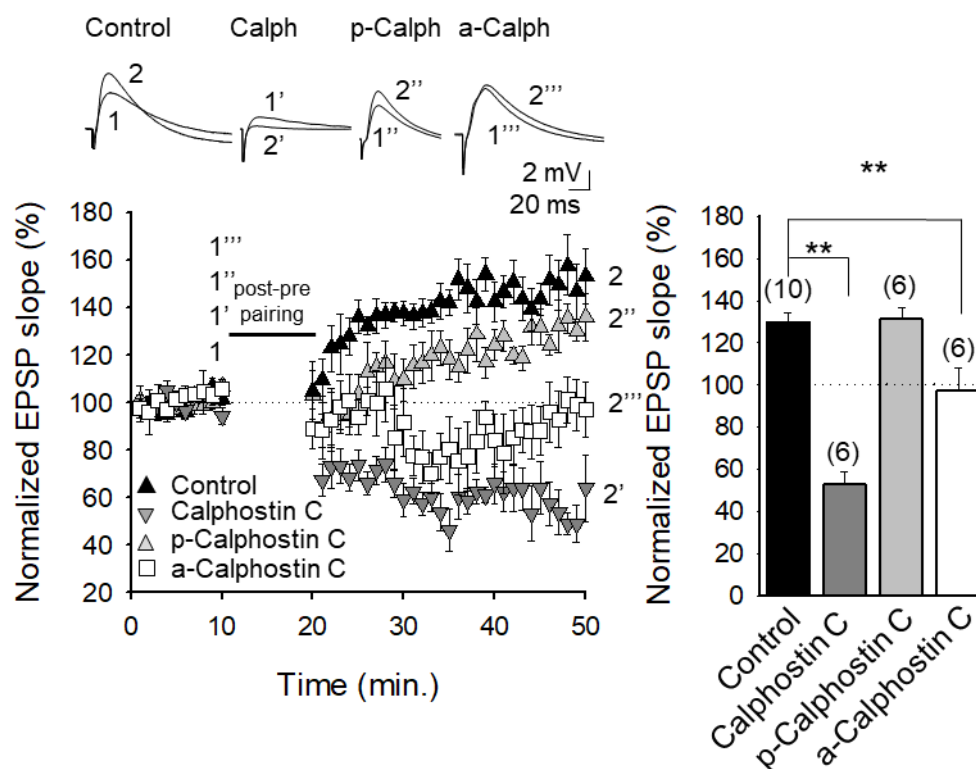


Figura 45: La proteína quinasa C (PKC) del astrocito interviene en la t-LTP. (A) Cursos temporales de eEPSP con calphostin C. Cuando se realizó el protocolo de pareamiento en presencia de calphostin C, se previno la inducción de la t-LTP y más aún, se observó una t-LTD. Seguidamente, cuando se introdujo calphostin C en la neurona postsináptica, la t-LTP permaneció inalterada. Por último, cuando este compuesto se introdujo en el astrocito, se previno la inducción de t-LTP. Los trazos muestran el eEPSP durante la línea base (1) y 30 minutos después de la aplicación del protocolo de plasticidad (2). (B) Resumen de resultados. El error representa el error estándar y el número de rodajas se manifiesta en paréntesis: ** $p < 0.01$, Test de t de Student.

V. Discusión

El presente trabajo muestra la presencia de los receptores presinápticos de glutamato en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1 en el hipocampo de ratón y su papel en plasticidad en las mismas sinapsis. Se caracterizó también la composición de subunidades de este receptor y se encontró que los receptores de tipo NMDA presinápticos contienen las subunidades GluN2B y GluN2C/2D.

El receptor presináptico de tipo NMDA interviene en una forma de t-LTD que puede inducirse pareando la actividad presináptica con un potencial postsináptico a baja frecuencia de estimulación. Esta t-LTD está presente hasta la tercera semana postnatal desapareciendo durante la cuarta semana de desarrollo. Junto con la desaparición de la t-LTD se produce el cese de la activación tónica de estos receptores NMDA presinápticos, que no se debe a cambios en la actividad de los transportadores de glutamato, sino posiblemente a una disminución en el número de receptores presinápticos de tipo NMDA durante el desarrollo.

Finalmente, el estudio del perfil de desarrollo demostró la existencia de una nueva forma de t-LTP de origen presináptico, en ratones a partir de P35, que no depende de la activación de receptores de tipo NMDA, pero sí de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR I) y que requiere de un aumento de la concentración de calcio postsináptico mediado por los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L y la liberación de calcio desde los reservorios internos. Este aumento de calcio intracelular induce la síntesis y liberación de óxido nítrico (NO) por parte de la neurona postsináptica, que alcanza a los astrocitos y los estimula induciendo una liberación de gliotransmisor, en la que participa la proteína quinasa C, que permite la inducción de esta forma de plasticidad.

1. Los receptores presinápticos de tipo NMDA tónicamente activos incrementan la liberación evocada y espontánea de glutamato en la sinapsis CA3-CA1.

Existen evidencias que sugieren que los receptores presinápticos de tipo NMDA pueden modular fisiológicamente la liberación de glutamato actuando como autorreceptores en diferentes sinapsis (Mameli et al. 2005; Jourdain et al. 2007). De hecho, en el presente trabajo se ha encontrado que el tratamiento con D-AP5 puede disminuir la liberación de glutamato incluso cuando la célula postsináptica o los astrocitos están bloqueados, confirmando su rol como autorreceptores en la sinapsis CA3-CA1. Además, estos receptores participan en plasticidad a P13-21 coincidiendo con un periodo crítico de plasticidad.

Las sinapsis frecuentemente muestran una alta probabilidad de liberación de neurotransmisor en una fase temprana del desarrollo, como se ha observado en la corteza somatosensorial (Sakmann et al. 2007), auditiva (Oswald y Reyes, 2008), visual (Cheetham y Fox, 2010) y prefrontal (Gonzalez-Burgos et al. 2008). Los receptores presinápticos de NMDA (PreNMDARs) se piensa que están tónicamente activos durante el desarrollo en algunas sinapsis como la entorrinal (Berreta y Jones, 1996), visual (Larsen et al. 2011) y somatosensorial (Brasier y Feldman, 2008). Con este trabajo extendemos esos resultados a la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo. Más importante, fue sugerido recientemente que la liberación espontánea y evocada eran mediadas por diferentes receptores de tipo NMDA en la corteza (Abrahamsson et al. 2017). Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo indican que ese no es el caso en el hipocampo, donde los mismos receptores de NMDA parecen modular tanto la liberación espontánea como evocada.

2. Composición de los receptores NMDA tónicamente activos implicados en la facilitación de liberación de glutamato.

La presencia de diferentes subpoblaciones de receptores de NMDA en distintas regiones del cerebro ha suscitado la idea de que diferentes subtipos de receptores de tipo NMDA desempeñan diferentes roles en el cerebro (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004). Usando agentes farmacológicos específicos para receptores de tipo NMDA que contienen diferentes subunidades, fue posible disociar diferentes formas de plasticidad en el hipocampo, con la LTP siendo dependiente de receptores que contienen la subunidad GluN2A pero no GluN2B y la LTD que requiere receptores que contienen la subunidad GluN2B pero no GluN2A (Wang et al. 2004), a pesar de que la situación ha sido desde entonces mostrándose más compleja con la posibilidad de que receptores presinápticos de NMDA y receptores postsinápticos de NMDA desempeñen funciones distintas (Berberich, 2005; Toyoda et al. 2005; Weitlauf, 2005; Morishita et al. 2007; Banerjee et al. 2009).

En este trabajo, hemos usado diferentes antagonistas para determinar la composición de subunidades de los receptores presinápticos de NMDA (Vergnano et al. 2014). Mientras que el antagonista de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A (Zn^{2+}) no afectó a la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1, los antagonistas Ro 25-6981 y PPDA, que actúan preferentemente sobre receptores que contienen las subunidades GluN2B y GluN2C/2D, respectivamente, previnieron completamente la activación tónica y la facilitación de la liberación de glutamato. El uso de PPDA no permite distinguir entre la activación de los receptores de NMDA que contienen la subunidad GluN2C o GluN2D, mientras no haya otros antagonistas que permitan hacer esta distinción tanto la subunidad GluN2C como GluN2D podrían estar involucradas en estos procesos. Es interesante el hecho de que Ro 25-6981 y PPDA no tengan efectos aditivos y produzcan un efecto muy similar al de D-AP5 lo que sugiere que estos receptores presinápticos de NMDA contienen tanto la subunidad GluN2B como la subunidad GluN2C/GluN2D, siendo posiblemente heterodímeros.

3. La actividad de la proteína quinasa A es necesaria para aumentar la liberación de glutamato mediada por la activación de receptores de tipo NMDA.

Las proteínas quinasas y fosfatasa se requieren para numerosos efectos de los receptores presinápticos de NMDA en el neocórtex (Kunz et al. 2013; Rodríguez-Moreno y Sihra, 2013) y el hipocampo (Andrade-Talavera et al. 2016). En la corteza visual, la proteína quinasa C (PKC) parece ser necesaria para la modulación de liberación de glutamato (Kunz et al. 2013), aunque en el caso de la sinapsis estudiada, no parece intervenir en el mecanismo de activación tónica de los receptores presinápticos de NMDA.

La proteína quinasa A (PKA) se encuentra implicada en la modulación de la liberación de glutamato y la LTP (Huganir y Nicoll, 2013) lo que ha llevado a comprobar su posible papel en la activación tónica de los receptores de NMDA y la facilitación de la liberación de glutamato.

En presencia de un bloqueador de la subunidad catalítica de la PKA (H-89), el efecto de D-AP5 sobre la transmisión sináptica fue impedido, indicando que la activación tónica y la facilitación de la liberación de glutamato requieren la activación de la PKA. Estos resultados fueron confirmados usando Ro 25-6981 y PPDA, indicando que cuando los receptores presinápticos de tipo NMDA están tónicamente activos, la PKA está activa e interviene en el aumento de la liberación de glutamato en la sinapsis CA3-CA1.

4. Receptores presinápticos ionotrópicos de tipo NMDA en el hipocampo.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la activación tónica de los receptores de NMDA está mediada por receptores presinápticos de tipo NMDA en el hipocampo (Bouvier et al. 2018), y que son receptores ionotrópicos no postsinápticos ni astrocíticos (el tratamiento con MK-801 de la neurona postsináptica o de los astrocitos no bloquea el efecto de D-AP5 sobre la respuesta evocada o espontánea). Además, el efecto es ionotrópico ya que MK-801 en el baño tiene un efecto similar que D-AP5. Como se ha demostrado en otras regiones, la plasticidad sináptica puede requerir PreNMDARs, por ejemplo: las cortezas somatosensorial o visual (Corlew et al. 2008; Larsen et al. 2011; Larsen et al. 2014). La presencia de los PreNMDARs en el hipocampo fue sugerida por experimentos que monitorizaban noradrenalina liberada en sinaptosomas (Pittaluga y Raiteri, 1990; Wang et al. 1992) y mediante inmunomicroscopia electrónica se demostró que los receptores de NMDA se encontraban como elementos presinápticos en el hipocampo (Pittaluga y Raiteri, 1990; Charton et al. 1999; Siegel et al. 2006, resultados extendidos a la sinapsis CA3-CA1, (Pérez-Rodríguez et al. 2018)

Estos receptores pueden estar involucrados en la *spike timing-dependent plasticity* (STDP) en la corteza visual (Larsen et al. 2011; Larsen et al. 2014) y somatosensorial (Bender et al. 2006; Corlew et al. 2008; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al. 2011; Rodríguez-Moreno y Sihra, 2013; Banerjee et al. 2014) con evidencias directas obtenidas en la capa 4/ capa 2-3 de la corteza somatosensorial (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al. 2011). En el hipocampo, los PreNMDARs se han propuesto que participan en la inducción de la LTP (McGuinness et al. 2010) y la LTD (Andrade-Talavera et al. 2016), así como autorreceptores para modular la transmisión sináptica (Mameli et al. 2005; Jourdain et al. 2007; Corlew et al. 2008) pero aún se necesitan más estudios para elucidar su localización exacta y sus roles fisiológicos en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo.

Si bien se tenía como objetivo definir la composición de subunidades de los receptores de NMDA involucrados en la activación tónica y el aumento de la liberación de glutamato en el hipocampo y proporcionar información sobre los mecanismos que facilitan la liberación de glutamato, futuros estudios de “*paired recordings*” en la sinapsis CA3-CA1 que incluyan la administración de MK-801 en la neurona presináptica, así como en la neurona postsináptica demostrarán de manera inequívoca la localización y naturaleza de estos receptores de NMDA. La liberación intracelular de MK-801 cajeado podría incluso identificar de manera más precisa la localización de estos receptores, como se ha mostrado en la sinapsis de la capa 4/ capa 2-3 de la corteza somatosensorial (Rodríguez-moreno et al. 2011; Reeve et al. 2012).

5. ¿Cuál es el rol fisiológico de la activación tónica de la liberación de glutamato?

Los PreNMDARs podrían servir para mantener altas probabilidades de liberación de glutamato, como se ha observado generalmente en las etapas tempranas del desarrollo. Esta alta probabilidad de liberación de neurotransmisores puede ser necesaria para establecer conexiones entre las neuronas presinápticas y las neuronas postsinápticas y para mantener la neurotransmisión cuando las neuronas postsinápticas siguen sin estar completamente desarrolladas (Rumpel et al. 2004).

En este trabajo se muestra que los receptores presinápticos de tipo NMDA pueden ser activados por la liberación tanto espontánea como evocada de glutamato, lo que indica que una mayor concentración de glutamato en la sinapsis puede activar a estos receptores durante las fases tempranas del desarrollo. De hecho, la alta probabilidad de liberación podría ser necesaria para establecer el correcto funcionamiento de las sinapsis y mediar en las diferentes formas de plasticidad durante esta etapa del desarrollo.

6. Pérdida de la t-LTD durante la cuarta semana de desarrollo.

En la segunda parte de esta memoria, se ha estudiado la plasticidad sináptica durante el desarrollo, desde P8 hasta P30, usando un protocolo que induce una robusta t-LTD desde P8 hasta P21. Dado que la t-LTD no es evidente en la sinapsis CA3-CA1 más allá de P21, de acuerdo con otras investigaciones, al reportar que la capacidad para provocar una depresión de la transmisión sináptica de larga duración en la sinapsis disminuye con la edad (Corlew et al. 2007; Banerjee et al. 2009; Andrade-Talavera et al. 2016). Estos resultados extienden el periodo de t-LTD reportada previamente para las sinapsis de la región CA3-CA1 en el hipocampo hasta el ratón joven adulto, y extienden también la pérdida durante el desarrollo de t-LTD observada en otras regiones del cerebro.

7. Los receptores presinápticos de NMDA aumentan la liberación espontánea y evocada a P13-21 pero no a P22-30.

Con D-AP5, se produce una disminución de la liberación de glutamato a P13-21 cuando los receptores NMDA postsinápticos se encuentran bloqueados con MK-801, lo que confirma la activación tónica de los receptores PreNMDARs en el hipocampo. Esta activación tónica y la modulación de la liberación de glutamato se pierden durante el desarrollo, sugiriendo una reducción en la probabilidad de liberación, como se ha observado en la corteza somatosensorial (Frick et al. 2007), auditiva (Oswald y Reyes, 2008), visual (Cheetham y Fox, 2010) y prefrontal (Gonzalez-Burgos et al. 2008). Los resultados presentados en este trabajo confirman que los PreNMDARs dejan de estar tónicamente activos cuando esta forma de plasticidad desaparece en P22-P30, sugiriendo una relación entre estos dos fenómenos. En este trabajo se demuestra esta relación manipulando la probabilidad de liberación de glutamato a través de cambios en la concentración extracelular de calcio, lo que afecta directamente a la plasticidad: la t-LTD puede ser prevenida a P13-21 disminuyendo la concentración de calcio extracelular y la pérdida de la t-LTD puede revertirse a P22-30 incrementando la concentración de calcio.

No está claro que es lo que ocurre de manera intracelular en el terminal presináptico para mediar la pérdida de la t-LTD cuando estos PreNMDARs no están tónicamente activos. Si estos efectos están mediados por diferentes grupos de PreNMDARs o son los mismos tipos de PreNMDARs los que activan distintas cascadas intracelulares es un asunto que requiere de futuros estudios. Se requiere calcineurina para que estos PreNMDARs medien la t-LTD, como se ha demostrado recientemente (Andrade-Talavera et al. 2016). Mientras el mecanismo por el cual la calcineurina media la t-LTD no es conocido, numerosas proteínas presinápticas podrían estar involucradas, como las que participan en exocitosis, endocitosis y en la regulación del tamaño de las vesículas de liberación, el reciclaje o la reserva de las vesículas sinápticas (Leenders y Sheng, 2005; Kim y Ryan, 2010) así como los canales de calcio presináptico (Kaesler y Sudhof, 2005; Kim y Ryan, 2013) y sus interacciones con la maquinaria de liberación vesicular.

8. ¿Cuál es el rol fisiológico de la pérdida de la t-LTD a P22-30?

La verdadera función de la STDP en el hipocampo sigue sin esclarecerse y se necesitan futuros estudios para determinar el papel específico de la t-LTD. La forma de LTD descrita en este trabajo solo es evidente hasta la tercera semana de vida, lo que indica su relevancia durante el desarrollo y posiblemente durante el refinamiento de las sinapsis. De hecho, la LTD se piensa que juega un papel importante en la plasticidad durante el desarrollo (Feldman y Brecht, 2005) en el que la LTD debilitaría las sinapsis excitatorias poco usadas o irrelevantes.

Diferentes cambios ocurren durante el refinamiento sináptico del hipocampo durante la maduración. Por ejemplo, hay un cambio en el tipo de espinas dendríticas a P30 cuando se compara con P15, con una disminución específica de las espinas en forma de seta (*mushroom spines*) Fig 46, si bien su correlación directa con la t-LTD está aún por determinarse.

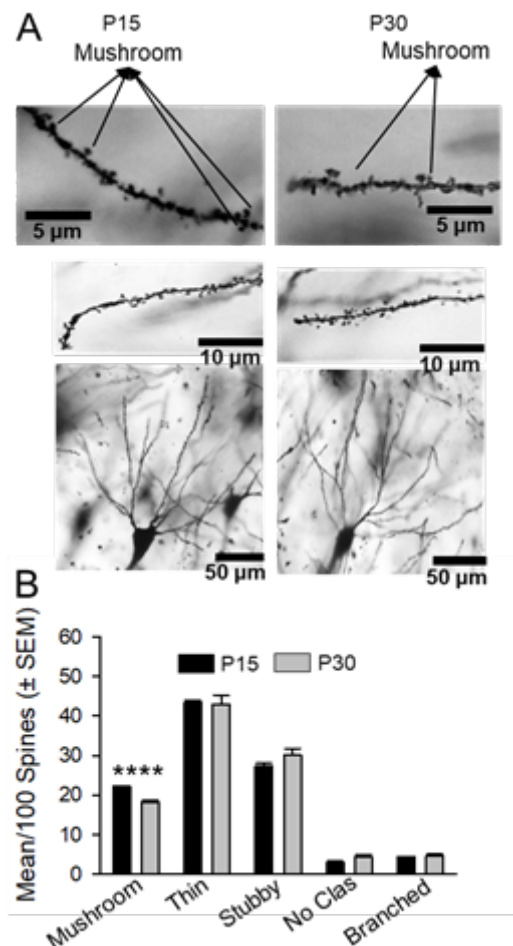


Figura 46: La maduración de P15 a P30 genera cambios en la morfología de las neuronas piramidales de CA1. (A) Desde P15 hasta P30 hay una disminución en el número de espinas tipo seta (*mushroom spines*) en las neuronas. Fotomicrografías representativas de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo teñidas con Golgi-Cox (40X) y segmentos distales dendríticos representativos (100X) a P15 y a P30. (B) Resumen de la distribución de las espinas. Las barras de error representan la media de error estándar: **** $p < 0.0001$, Test de t de Student. En colaboración con José A. Armengol y Eva M. Pérez Villegas.

Estos datos sugieren que hay cambios en la densidad de este tipo de espinas durante la maduración, consistentes con la eliminación de las conexiones sinápticas inútiles o contraproducentes por medio de la LTD (Mel et al. 2017). Nuevos experimentos en los que se midan cambios en los terminales de dendritas y axones mientras se realizan estudios de plasticidad indicarían directamente el rol exacto de esta forma de t-LTD y la significancia morfológica del cierre de esta ventana de plasticidad.

9. Aparición de una t-LTP a P35-42.

Los resultados obtenidos muestran una t-LTP en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo, en ratón joven adulto P35-42, cuando se pareo la actividad presináptica con un solo potencial de acción postsináptico a baja frecuencia (0.2 Hz). Esta forma de plasticidad no requiere de receptores de tipo NMDA y es de expresión presináptica, como se ha demostrado con los análisis de los experimentos por facilitación de pares de pulsos y de probabilidad de fallos en la transmisión sináptica.

Para la inducción de esta t-LTP presináptica, se requiere entrada de calcio por canales voltaje dependientes de tipo L en la neurona postsináptica, liberación de calcio de reservorios intracelulares, la activación de receptores metabotrópicos presinápticos de glutamato, señalización de la célula postsináptica al astrocito mediada por óxido nítrico (NO), activación de la PKC del astrocito y liberación vesicular de gliotransmisores.

En este trabajo, todos los abordajes experimentales sugieren que el astrocito es un mediador necesario de esta forma de plasticidad sináptica, mediando un aumento de liberación de neurotransmisor en el terminal presináptico que conduce a una potenciación de larga duración.

10. Papel de los receptores de tipo NMDA en la t-LTP en P35-42.

Como se ha visto anteriormente en este trabajo, en las etapas tempranas del desarrollo los receptores presinápticos de tipo NMDA se encuentran tónicamente activos manteniendo una mayor probabilidad de liberación de glutamato. El carácter presináptico de esta forma de LTP y el papel en la t-LTD que tienen los receptores presinápticos de tipo NMDA a P13-21 cuando se someten al mismo protocolo de apareamiento, hace necesario comprobar si la t-LTP está mediada por receptores de tipo NMDA a P35-42.

Con D-AP5 o MK-801 en el baño, no es posible prevenir la inducción de la t-LTP lo que indica que los receptores de tipo NMDA no participan ni presináptica ni postsinápticamente en esta forma de plasticidad de larga duración.

Seguidamente se determinó si los receptores metabotrópicos de glutamato participan en esta forma de LTP. En presencia del antagonista de receptores metabotrópicos del grupo II, LY341495, se previene la inducción de esta LTP. Previamente, se han relacionado los receptores mGluR I en procesos de plasticidad, por lo que se realizaron experimentos en presencia de los antagonistas de mGluR del grupo I, LY367385 y de MPEP. La aplicación de LY367385 no previno la t-LTP, pero si MPEP, indicando que los receptores mGlu5, pero no los receptores mGlu1a participan en la inducción de esta forma de plasticidad.

Por último, para conocer la localización de estos receptores metabotrópicos en esta t-LTP presináptica, se utilizó GDP β S de manera postsináptica y en el astrocito, en ninguna de estas dos situaciones se previno la inducción de la t-LTP. Estos datos indican que es necesaria la acción de receptores metabotrópicos de glutamato en la neurona presináptica para inducir la t-LTP.

11. La t-LTP requiere la entrada de calcio en la célula postsináptica.

Los resultados obtenidos muestran que la t-LTP requieren un aumento del calcio postsináptico, ya que esta forma de plasticidad se bloquea en presencia de BAPTA en la neurona postsináptica.

El aumento de calcio postsináptico proviene tanto de los reservorios intracelulares de calcio como del espacio extracelular a través de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L. Esta entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje de tipo L coincide con otras formas de LTP presináptica (Padamsey et al. 2017).

12. La neurona postsináptica produce óxido nítrico.

Para determinar que molécula podría ser la responsable de la comunicación retrógrada de esta t-LTP se realizaron varios experimentos. Los endocannabinoides (eCBs), con un conocido papel como mensajeros intercelulares en procesos de plasticidad sináptica, no intervienen en esta forma de plasticidad, como se ha visto al no prevenirse la t-LTP en presencia de THL, AM-251 o la incapacidad de recuperarla en presencia de 2-AG, un agonista de los receptores CB₁, cuando la neurona postsináptica se encuentra bloqueada por BAPTA. En conjunto, estos resultados indican que el sistema de señalización de receptores cannabinoides CB₁ no es necesario para la inducción de esta forma de LTP.

Por lo tanto, se investigó el papel del óxido nítrico (NO), ya que se ha visto que está involucrado en algunas formas de plasticidad (Padamsey et al. 2017). Otros autores ya han visto que el NO puede actuar como un mensajero intercelular y se encuentra implicado en procesos de plasticidad sináptica, por lo que se procedió a investigar si tiene un papel en esta t-LTP (Schuman y Madison, 1991; Schuman y Madison, 1994; Hawkins et al. 1996).

La aplicación de Carboxy-PTIO, una molécula que se conjuga con el NO y lo elimina del medio, resultó en la imposibilidad de inducir la t-LTP. Para determinar si la neurona postsináptica es la responsable de la generación de NO, se incluyó L-NAME en la pipeta de registro de la neurona postsináptica para prevenir la producción de óxido nítrico de manera específica, y de nuevo, no fue posible inducir la t-LTP. Estos resultados demuestran que la neurona postsináptica genera NO cuando es estimulada por el protocolo de pareamiento.

13. Se requieren los astrocitos para la inducción de la t-LTP.

Se han utilizado varios métodos para investigar la participación de los astrocitos en la t-LTP. Primero, la gliotoxina fluoracetato previno la inducción de la t-LTP. Segundo, al cargar los astrocitos con el quelante de calcio BAPTA, se abole completamente la t-LTP, lo que sugiere que se necesita una liberación de gliotransmisores para inducir la t-LTP en la sinapsis CA3-CA1. Tercero, se utilizó el mutante dnSNARE, que presenta un bloqueo de la liberación vesicular de los astrocitos, que también evitó la inducción de la t-LTP, indicando que la liberación de gliotransmisores debe producirse de manera mayoritariamente vesicular.

Los astrocitos son estimulados por el NO liberado por la célula postsináptica.

Como se ha demostrado anteriormente, la neurona postsináptica genera NO en respuesta al protocolo de pareamiento por lo que se quiso determinar si el astrocito podía responder a este estímulo. Además, como el NO puede ser producido por las neuronas piramidales y los astrocitos, es necesario elucidar si la única fuente de NO es la neurona postsináptica o si, por el contrario, el astrocito también producirlo.

Los experimentos cuando Carboxy-PTIO se encuentra en el astrocito, demuestran es capaz de detectar aumentos de la concentración de NO. Lo que provoca la liberación de gliotransmisores de manera vesicular, como se ha comprobado gracias al uso del mutante dnSNARE, y de manera localizada, dado el poco rango de acción que posee el óxido nítrico para llevar a cabo su acción como mensajero (Hardingham et al. 2013). Además, el astrocito no es la fuente de NO ni requiere sintetizar más para llevar a cabo su función en esta t-LTP, ya que cuando L-NAME se encuentra en el astrocito, se induce la t-LTP.

La t-LTP requiere de la activación de la proteína quinasa C del astrocito.

El Sistema Nervioso Central de los mamíferos contiene altas concentraciones de la proteína quinasa C (PKC), enzima a la que se le atribuyen importantes funciones en el desarrollo neuronal, modulación de canales iónicos, liberación de neurotransmisores u fenómenos de plasticidad (Tanaka y Nishizuka, 1994). La PKC ejerce una potente acción facilitadora sobre la transmisión sináptica, efecto que ha sido descrito en rodajas de tejido cerebral (Malenka et al. 1986; Honda et al. 2000; Francis et al. 2002).

En este trabajo, se ha demostrado que la proteína quinasa C está involucrada en la inducción de esta t-LTP. Cuando se utiliza el bloqueador de PKC, calphostin C, en la neurona postsináptica no se impide la t-LTP, pero si cuando esta sustancia se encuentra en el astrocito, lo que indica que la PKC del astrocito interviene en la inducción de esta forma de plasticidad.

14. ¿Cuál es el rol fisiológico de esta LTP a P35-42?

La aparición de esta t-LTP podría significar la maduración de las conexiones sinápticas que se han ido estableciendo a lo largo del desarrollo cerebral. Además, el hecho de que el mismo protocolo de pareamiento sea capaz de inducir dos cambios opuestos en la misma sinapsis, sugiere que es posible que la inducción de una potenciación o depresión a largo plazo no solo depende de los receptores que se encuentren en las membranas pre y postsinápticas, sino del entorno químico particular de esa sinapsis, donde el astrocito ejercería un papel muy importante como neuromodulador.

Se ha descrito una LTP que involucra a la PKC, receptores metabotrópicos de glutamato presinápticos, producción de NO en la neurona postsináptica y la intervención de los astrocitos (Gómez-Gonzalo et al. 2014), pero en ese caso, la PKC parece ejercer su acción en los terminales presinápticos y la despolarización para la liberación vesicular del astrocito está mediada por eCBs. Estos resultados podrían sugerir que existen mecanismos moleculares con agentes comunes para distintas formas de LTP, siendo algunos de ellos conservados a lo largo del perfil de desarrollo.

En conclusión, el presente trabajo muestra los cambios plásticos, mecanismos celulares y moleculares que ocurren a lo largo del desarrollo postnatal en la sinapsis de los axones colaterales de Schaffer con las dendritas de las neuronas de la región CA1 en el hipocampo de ratón. Se ha determinado la existencia de receptores presinápticos de tipo NMDA en esta sinapsis, su composición en subunidades (GluN2B/GluN2C/2D) y su función como autorreceptores que activan la PKA para aumentar la liberación de glutamato a P13-21. Se ha comprobado el rol que desempeñan en la t-LTD a P8-21, donde su inactivación está involucrada en la pérdida de t-LTD a P22-30. Posteriormente, se han esclarecido los mecanismos celulares y moleculares que median la aparición de una nueva forma de t-LTP a P35-42, que es independiente de receptores de tipo NMDA. Para esta nueva forma de plasticidad, se requieren receptores metabotrópicos de glutamato presinápticos, la entrada de calcio en la neurona postsináptica, la generación de NO para señalizar al astrocito, que a su vez se despolariza y libera gliotransmisores en un proceso que requiere de PKC y generan una potenciación de larga duración de la transmisión sináptica en la sinapsis CA3-CA1.

VI.Conclusiones

CONCLUSIONS (English)

1. Functional ionotropic presynaptic NMDA receptors are present at hippocampal CA3-CA1 synapses.
2. Presynaptic NMDA receptors act as autorreceptors and are tonically active mediating an increase in the evoked and spontaneous glutamatergic synaptic transmission at CA3-CA1 synapses.
3. Tonically active presynaptic NMDA receptors involved in the facilitation of glutamate release contain GluN2B/GluN2C/2D subunits.
4. Protein kinase A activity is necessary for the increase in glutamate release mediated by the activation of presynaptic ionotropic NMDA receptors modulating glutamate release at CA3-CA1 synapses.
5. Tonic activity of presynaptic NMDARs is present at P13–21 but disappears at P22–30 at CA3-CA1 synapses.
6. A presynaptic form of t-LTD is present at P8-21 at CA3-CA1 synapses. This form of LTD disappears during the fourth week of development.
7. A “switch” from t-LTD to t-LTP occurs during the 5th week of development
8. t-LTP that appears since P35 is presynaptically expressed and independent of NMDA receptors but dependent on presynaptic mGluRs I.
9. t-LTP requires calcium activity in the postsynaptic neurons to produce nitric oxide at CA3-CA1 synapses.
10. Astrocyte signaling is necessary for t-LTP induction. Astrocytes are possibly stimulated by nitric oxide from the postsynaptic neuron and releasing gliotransmitter/s to induce t-LTP.

CONCLUSIONES (Español)

1. Los receptores presinápticos ionotrópicos de tipo NMDA están presentes en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo.
2. Los receptores presinápticos de tipo NMDA actúan como autorreceptores y están tónicamente activos mediando un incremento en la transmisión sináptica evocada y espontánea de glutamato en la sinapsis CA3-CA1.
3. Los receptores presinápticos tónicamente activos de tipo NMDA que están involucrados en la facilitación de la liberación de glutamato contienen las subunidades GluN2B/GluN2C/2D.
4. La actividad de la proteína quinasa A es necesaria para el incremento de la liberación de glutamato mediado por la activación de los receptores presinápticos ionotrópicos de tipo NMDA en la sinapsis CA3-CA1.
5. La actividad tónica de los receptores presinápticos de tipo NMDA está presente a P13-21 pero desaparece a P22-30.
6. Una forma de t-LTD presináptica está presente a P8-21 en la sinapsis CA3-CA1 y desaparece durante la cuarta semana de desarrollo.
7. La t-LTD se convierte en t-LTP durante la quinta semana de desarrollo al aplicar el mismo protocolo de plasticidad.
8. La t-LTP que aparece desde P35 se expresa de manera presináptica y es independiente de receptores de tipo NMDA, pero depende de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I presinápticos.
9. La t-LTP requiere de la actividad de calcio en la neurona postsináptica para producir óxido nítrico en la sinapsis CA3-CA1.
10. La señalización de los astrocitos es necesaria para la inducción de la t-LTP. Los astrocitos podrían ser estimulados por el óxido nítrico de la neurona postsináptica para liberar gliotransmisor(es) que participan en la inducción de la t-LTP.

VII. Referencias Bibliográficas

- Abbott, L. F., & Blum, K. (1996). Functional significance of LTP for sequence learning and prediction. *Cerebral Cortex* 6, 406–416.
- Abbott, L. F., Song, S., & Miller, K. D. (2000). Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nature Neuroscience* 3, 919–926.
- Abrahamsson, T., Chou, C. Y. C., Li, S. Y., Mancino, A., Costa, R. P., Brock, J. A., ... Sjöström, P. J. (2017). Differential Regulation of Evoked and Spontaneous Release by Presynaptic NMDA Receptors. *Neuron* 96, 839–855.
- Agulhon, C., Boyt, K. M., Xie, A. X., Friocourt, F., Roth, B. L., & McCarthy, K. D. (2013). Modulation of the autonomic nervous system and behaviour by acute glial cell G q protein-coupled receptor activation in vivo. *Journal of Physiology* 591, 5599–5609.
- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., & Mizuno, N. (1994). Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *Journal of Comparative Neurology* 347, 150–160.
- Al-Hallaq, R. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., & Wenthold, R. J. (2007). NMDA Diheteromeric Receptor Populations and Associated Proteins in Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 27, 8334–8343.
- Andersen P, Morris R, Amaral D, T.V. and O'Keefe J. (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- Andersson, M., Blomstrand, F., & Hanse, E. (2007). Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region. *Journal of Physiology* 585, 843–852.
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Paulsen, O., & Rodríguez-Moreno, A. (2016). Presynaptic Spike Timing-Dependent Long-Term Depression in the Mouse Hippocampus. *Cerebral Cortex* 26, 3637–3654.
- Antonov, I., Antonova, I., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (2003). Activity-dependent presynaptic facilitation and Hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in Aplysia. *Neuron* 37, 135–147.
- Anwyl, R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: Electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Research Reviews* 29, 83–120.
- Arancio, O., Lev-Ram, V., Tsien, R. Y., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (1996). Nitric oxide acts as a retrograde messenger during long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Journal of Physiology Paris* 90, 321–322.
- Araque, A., Li, N., Doyle, R. T., & Haydon, P. G. (2000). SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *The Journal of Neuroscience* 20, 666–673.
- Araque, A., & Navarrete, M. (2010). Glial cells in neuronal network function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 2375–2381.

- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience* 10, 2129–2142.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet Stéphane H. R., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014). Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81, 728–739.
- Bailey, C. H., & Kandel, E. R. (2008). Chapter 10 Synaptic remodeling, synaptic growth and the storage of long-term memory in Aplysia. In *Progress in Brain Research* 169, 179-198.
- Banerjee, A., González-Rueda, A., Sampaio-Baptista, C., Paulsen, O., & Rodríguez-Moreno, A. (2014). Distinct mechanisms of spike timing-dependent LTD at vertical and horizontal inputs onto L2 / 3 pyramidal neurons in mouse barrel cortex. *Physiological Reports* 2(3)e00271.
- Banerjee, A., Meredith, R. M., Rodríguez-Moreno, A., Mierau, S. B., Auberson, Y. P., & Paulsen, O. (2009). Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptor antagonists in mouse barrel cortex. *Cerebral Cortex* 19, 2959-2969.
- Banke, T. G. (2005). Protons Trap NR1/NR2B NMDA Receptors in a Nonconducting State. *Journal of Neuroscience* 25, 42–51.
- Baranyi, A. & Fehér, O (a). (1981). Synaptic facilitation requires paired activation of convergent pathways in the neocortex. *Nature* 290, 413–415.
- Baranyi, A & Fehér O (b). (1981). Intracellular Studies on Cortical Synaptic Plasticity. *Experimental Brain Research* 41, 124–134.
- Barria, Andres and Malinow, R. (2002). Subunit-Specific NMDA Receptor Trafficking to Synapses. In *Protein Trafficking in Neurons*. *Neuron* 35, 345-353.
- Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: The third wave. *Nature Neuroscience* 19, 182–189.
- Bell, C., Han, V., Sugawara, Y., & Grant, K. (1997). Synaptic plasticity in a cerebellum-like structure depends on temporal order. *Nature* 387, 278-281.
- Bender, V., KJ, B., Brasier, D., & Feldman, D. (2006). Two Coincidence Detectors for Spike Timing-Dependent Plasticity in Somatosensory Cortex. *Journal of Neuroscience* 26, 4166–4177.
- Berberich, S. (2005). Lack of NMDA Receptor Subtype Selectivity for Hippocampal Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience* 25, 6907–6910.
- Berreta, N., & Jones, R. S. G. (1996). Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autorreceptors in the entorhinal cortex. *Neuroscience* 75, 339–344.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., & Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature Neuroscience* 7, 613–620.

- Bi, G., & Poo, M. (1998). Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on Spike timing, synaptic strength and postsynaptic cell type. *Journal of Neuroscience* 18, 1–9.
- Bidoret, C., Ayon, A., Barbour, B., & Casado, M. (2009). Presynaptic NR2A-containing NMDA receptors implement a high-pass filter synaptic plasticity rule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 14126–14131.
- Bissiere, S., Luthi, A., Humeau, Y., & Shaban, H. (2003). Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 426, 841–845.
- Blackman, A. V., Abrahamsson, T., Costa, R. P., Lalanne, T., & Sjöström, P. J. (2013). Target-cell-specific short-term plasticity in local circuits. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 5: 11.
- Bliss, T. V. & T. L. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 232, 357–374.
- Bliss, T. V. P., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of synchrony. *Nature* 362, 31–39.
- Bohmbach, K., Schwarz, M. K., Schoch, S., & Henneberger, C. (2018). The structural and functional evidence for vesicular release from astrocytes in situ. *Brain Research Bulletin* 136, 65–75.
- Bouvier, G., Larsen, R. S., Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O., & Sjöström, P. J. (2018). Towards resolving the presynaptic NMDA receptor debate. *Current Opinion in Neurobiology* 51, 1–7.
- Bowser, D. N., & Khakh, B. S. (2004). ATP Excites Interneurons and Astrocytes to Increase Synaptic Inhibition in Neuronal Networks. *The Journal of Neuroscience* 24, 8606–8620.
- Brasier, D., & Feldman, D. E. (2008). Synapse-Specific Expression of Functional Presynaptic NMDA Receptors in Rat Somatosensory Cortex. *The Journal of Neuroscience* 28, 2199–2211.
- Brenner, M., Kisseberth, W., Su, Y., Besnard, F., & Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience* 14, 1030–1037.
- Buchanan, K. A., Blackman, A. V., Moreau, A. W., Elgar, D., Costa, R. P., Lalanne, T., ... Sjöström, P. J. (2012). Target-Specific Expression of Presynaptic NMDA Receptors in Neocortical Microcircuits. *Neuron* 75, 451–466.
- Burrone, J., Byrne, M. O., & Murthy, V. N. (2002). Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature* 420, 414–418.
- Butz, M., Wörgötter, F., & van Ooyen, A. (2009). Activity-dependent structural plasticity. *Brain Research Reviews* 60, 287–305.
- Caporale, N., & Dan, Y. (2008). Spike Timing–Dependent Plasticity: A Hebbian Learning Rule. *Annual Review of Neuroscience* 31, 25–46.
- Casado, M., Isope, P., & Ascher, P. (2002). Involvement of Presynaptic N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Cerebellar Long-Term Depression. *Neuron* 33, 123–130.

- Chamberlain, S. E. L., Yang, J., & Jones, R. S. G. (2008). The role of NMDA receptor subtypes in short-term plasticity in the rat entorhinal cortex. *Neural Plasticity* 2008, 872456.
- Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R., & Sandersont, M. J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: Calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6, 983–992.
- Charton, J. P., Herkert, M., Becker, C. M., & Schröder, H. (1999). Cellular and subcellular localization of the 2B-subunit of the NMDA receptor in the adult rat telencephalon. *Brain Research* 816, 609–617.
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., ... Zhang, D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415, 793–798.
- Cheetham, C. E. J., & Fox, K. (2010). Presynaptic development at L4 to L2/3 excitatory synapses follows different time courses in visual and somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience* 30, 12566-12571.
- Chen, N., Sugihara, H., Sharma, J., Perea, G., Petravic, J., & Le, C. (2012). Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2832-2841.
- Chevalere, V., & Castillo, P. E. (2003). Heterosynaptic LTD of Hippocampal GABAergic Synapses: A Novel Role of Endocannabinoids in Regulating Excitability. *Neuron* 38, 461–472.
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18–41.
- Corlew, R., Brasier, D., Feldman, D., & Philpot, B. (2008). Presynaptic NMDA Receptors: Newly Appreciated Roles in Cortical Synaptic Function and Plasticity. *Neuroscientist* 14, 609-625.
- Corlew, Rebekah, Erisir, A., Ghermazien, H., Wang, Y., & Philpot, B. D. (2007). Developmental switch in the contribution of presynaptic and postsynaptic NMDA receptors to long-term depression. *Journal of Neuroscience* 27, 9835-9845.
- Cornell-bell, A. N. N. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling. *Science* 247, 470-473.
- Covelo, A., & Araque, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *eLife* e32237.
- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. *Science Signaling* 2004, re16.
- Dan, Y., & Poo, M. M. (2001). Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron* 32, 1149–1164.
- Dani, J. W., Chernjavsky, A., & Smith, S. J. (1992). Neuronal Activity Triggers Calcium Waves in Hippocampal Astrocyte Networks. *Neuron* 8, 429–440.

- Debanne, D., Gähwiler, B. H., & Thompson, S. M. (1994). Asynchronous pre- and postsynaptic activity induces associative long-term depression in area CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 1148–1152.
- Debanne, D., Gähwiler, B. H., & Thompson, S. M. (1996). Cooperative interactions in the induction of long-term potentiation and depression of synaptic excitation between hippocampal CA3-CA1 cell pairs in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 11225–11230.
- Dittman, J. S., Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2000). Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *The Journal of Neuroscience* 20, 1374–1385.
- Dudek, S. M., & Bear, M. F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Neurobiology* 89, 4363–4367.
- Dunwiddie, T., & Lynch, G. (1978). Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency. *The Journal of Physiology* 276, 353–367.
- Eiji Shigetomi, David N. Bowser, M. V. S., & Khakh, B. S. (2008). Two Forms of Astrocyte Calcium Excitability Have Distinct Effects on NMDA Receptor-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 46, 220–231.
- Eriksson, P. S., Nilsson, M., Wågberg, M., Hansson, E., & Rönnbäck, L. (1993). Kappa-opioid receptors on astrocytes stimulate l-type Ca^{2+} channels. *Neuroscience* 54, 401–407.
- Erreger, K., Dravid, S. M., Banke, T. G., Wyllie, D. J. A., & Traynelis, S. F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *Journal of Physiology* 563, 345–358.
- Fage, D., Voltz, C., Scatton, B., & Carter, C. (1992). Selective Release of Spermine and Spermidine from the Rat Striatum by N-Methyl-d-Aspartate Receptor Activation In Vivo. *Journal of Neurochemistry* 58, 2170–2175.
- Feldman, D. E. (2012). The spike-timing dependence of plasticity. *Neuron* 75, 556–571.
- Feldman, D. E., & Brecht, M. (2005). Map plasticity in somatosensory cortex. *Science* 310, 810–815.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743.
- Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J. N., Mohacsi, E., ... Kemp, J. A. (1997). Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283, 1285–1292.
- Fortune, E. S., & Rose, G. J. (2001). Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends in Neurosciences* 24, 381–385.

- Francis, H. W., Scott, J. C., & Manis, P. B. (2002). Protein kinase C mediates potentiation of synaptic transmission by phorbol ester at parallel fibers in the dorsal cochlear nucleus. *Brain Research* 951, 9–22.
- Frick, A., Feldmeyer, D., & Sakmann, B. (2007). Postnatal development of synaptic transmission in local networks of L5A pyramidal neurons in rat somatosensory cortex. *Journal of Physiology* 585, 103–116.
- Fuhrmann, G., Segev, I., Markram, H., & Tsodyks, M. (2002). Coding of Temporal Information by Activity-Dependent Synapses. *Journal of Neurophysiology* 87, 140–148.
- Fujita, T., Chen, M. J., Li, B., Smith, N. A., Peng, W., Sun, W., ... Nedergaard, M. (2014). Neuronal Transgene Expression in Dominant-Negative SNARE Mice. *Journal of Neuroscience* 34, 16594–16604.
- Gladding, C. M., & Raymond, L. A. (2011). Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Molecular and Cellular Neuroscience* 48, 308–320.
- Gómez-Gonzalo, M., Navarrete, M., Perea, G., Covelo, A., Martín-fernández, M., Shigemoto, R., ... Covelo, A. (2014a). Endocannabinoids Induce Lateral Long-Term Potentiation of Transmitter Release by Stimulation of Gliotransmission. *Cerebral Cortex* 25, 3699–3712.
- Gonzalez-Burgos, G., Kroener, S., Zaitsev, A. V., Povysheva, N. V., Krimer, L. S., Barrionuevo, G., & Lewis, D. A. (2008). Functional maturation of excitatory synapses in layer 3 pyramidal neurons during postnatal development of the primate prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 18, 626–637.
- Gray, J. A., Shi, Y., Usui, H., During, M. J., Sakimura, K., & Nicoll, R. A. (2011). Distinct Modes of AMPA Receptor Suppression at Developing Synapses by GluN2A and GluN2B: Single-Cell NMDA Receptor Subunit Deletion In Vivo. *Neuron* 71, 1085–1101.
- Guerra-Gomes, S., Sousa, N., Pinto, L., & Oliveira, J. F. (2018). Functional Roles of Astrocyte Calcium Elevations: From Synapses to Behavior. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11: 427.
- Haas, J. S., Nowotny, T., & Abarbanel, H. D. I. (2006). Spike-Timing-Dependent Plasticity of Inhibitory Synapses in the Entorhinal Cortex. *Journal of Neurophysiology* 96, 3305–3313.
- Hansen, K. B., Ogden, K. K., Yuan, H., & Traynelis, S. F. (2014). Distinct functional and pharmacological properties of triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors. *Neuron* 81, 1084–1096.
- Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., & Traynelis, S. F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *Journal of General Physiology* 150, 1081–1105.
- Hardingham, N., Dachtler, J., & Fox, K. (2013). The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7: 190.
- Hatton, C. J., & Paoletti, P. (2005). Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* 46, 261–274.

- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behaviour*. Wiley, New York.
- Heifets, B. D., & Castillo, P. E. (2009). Endocannabinoid Signaling and Long-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Physiology* 71, 283–306.
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Pérez-Otaño, I., & Philpot, B. D. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Progress in Neurobiology* 91, 23–37.
- Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes. *Current Problems and Biophysical approaches* 22, 283-294.
- Honda, I., Kamiya, H., & Yawo, H. (2000). Re-evaluation of phorbol ester-induced potentiation of transmitter release from mossy fibre terminals of the mouse hippocampus. *Journal of Physiology* 529, 763–776.
- Horak, M., & Wenthold, R. J. (2009). Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *Journal of Biological Chemistry* 284, 9683–9691.
- Hu, G.-Y., & Hvalby, O. (1987). Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long-term potentiation. *Nature* 328, 426-429.
- Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron* 80, 704–717.
- Ishikawa, M., Otaka, M., Huang, Y. H., Neumann, P. A., Winters, B. D., Grace, A. A., ... Dong, Y. (2013). Dopamine Triggers Heterosynaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience* 33, 6759–6765.
- Ishizuka, N., Weber, J., & Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 295, 580–623.
- Jennings, A., Tyurikova, O., Bard, L., Zheng, K., Semyanov, A., Henneberger, C., & Rusakov, D. A. (2017). Dopamine elevates and lowers astroglial Ca²⁺ through distinct pathways depending on local synaptic circuitry. *Glia* 65, 447–459.
- Johnson, J. W., & Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529-531.
- Johnston, D., & Amaral, D. (1998). *The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press, 417–459.
- Jourdain, P., Bergersen, L. H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., ... Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature Neuroscience* 10, 331–339.
- Kaesler, P. S., & Sudhof, T. C. (2005). RIM function in short-and long-term synaptic plasticity Structure and protein interactions of RIMs (Rab3-interacting molecules). *Biochemical Society Transactions* 33, 1345–1349.
- Kandel; Tauc. (1964). Mechanisim of prolonged heterosynaptic facilitation. *Nature* 202, 179–181.

- Kandel, E. R., Jessell, T. M., & Schwartz, J. H. (2000). *Principles of Neuroscience* 4th ed., McGraw-Hill, New York. USA
- Kandler, K., & Katz, K. (1998). Focal photolysis of caged glutamate produces long-term depression of hippocampal glutamate receptors. *Nature Neuroscience* 1, 119–123.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience* 1, 683–692.
- Káradóttir, R., Cavelier, P., Bergersen, L. H., & Attwell, D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438, 1162–1166.
- Karakas, E., Simorowski, N., & Furukawa, H. (2011). Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475, 249–253.
- Karmal, A. (1999). Chemical LTD in the CA1 field of the hippocampus from young and mature rats. *European Journal of Neuroscience* 11, 3512–3516.
- Kempter, R., Gerstner, W., Hemmen, V., & J. (2001). Intrinsic stabilization of output rates by spike-time dependent Hebbian learning. *Neural Computation* 13, 2709–2742.
- Khakh, B. S., Sofroniew, M. V., Angeles, L., & Angeles, L. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience* 18, 942–952.
- Kim, S. H., & Ryan, T. A. (2010). CDK5 Serves as a Major Control Point in Neurotransmitter Release. *Neuron* 67, 797–809.
- Kim, S. H., & Ryan, T. A. (2013). Balance of calcineurin $\text{A}\alpha$ and CDK5 activities sets release probability at nerve terminals. *Journal of Neuroscience* 33, 4288–4312.
- Kirkwood, A., Rozas, C., Kirkwood, J., Perez, F., & Bear, M. F. (1999). Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, 1599–1609.
- Kleckner, N. W., & Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in xenopus oocytes. *Science* 241, 835–837.
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Anatol. Neuron* 6, 1249–1254.
- Kumar, S. S., & Huguenard, J. R. (2018). Pathway-Specific Differences in Subunit Composition of Synaptic NMDA Receptors on Pyramidal Neurons in Neocortex. *The Journal of Neuroscience* 38, 10074–10083.
- Kunz, P. A., Roberts, A. C., & Philpot, B. D. (2013). Presynaptic NMDA Receptor Mechanisms for Enhancing Spontaneous Neurotransmitter Release. *Journal of Neuroscience* 33, 7762–7769.
- Lindong Liu, Tak Pan Wong, Mario F. Pozza, Kurt Lingenhoehl, Yushan Wang, Morgan Sheng, Yves P. Auberson, Yu Tia... (2004). Role of NMDA Receptor Subtypes in Governing the Direction of Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science* 304, 1021–1024.

- Larsen, R. S., Corlew, R. J., Henson, M. A., Roberts, A. C., Mishina, M., Watanabe, M., ... Philpot, B. D. (2011). Nr3a-containing NMDA receptors promote neurotransmitter release and spike timing-dependent plasticity. *Nature Neuroscience* 14, 338-344.
- Larsen, R. S., Rao, D., Manis, P. B., & Philpot, B. D. (2010). STDP in the developing sensory neocortex. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2: 9.
- Larsen, R., Smith, I., Miriyala, J., Han, J., Corlew, R., Smith, S., & Philpot, B. (2014). Synapse-Specific Control of Experience-Dependent Plasticity by Presynaptic NMDA Receptors. *Neuron* 83, 879-893.
- Larson, J., & Munkácsy, E. (2015). Theta-burst LTP. *Brain Research* 1621, 38–50.
- Laurie, D., & Seeburg, P. (2018). Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *The Journal of Neuroscience* 14, 3180–3194.
- Le Bail, M., Martineau, M., Sacchi, S., Yatsenko, N., Radzishevsky, I., Conrod, S., ... Mothet, J.-P. (2014). Identity of the NMDA receptor coagonist is synapse specific and developmentally regulated in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E204–E213.
- Lee, H. K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M. F., & Huganir, R. L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405, 955–959.
- Lee, H. K., Kameyama, K., Huganir, R. L., & Bear, M. F. (1998). NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21, 1151–1162.
- Leenders, M., & Sheng, Z.-H. (2005). Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases. *Pharmacol Theraphy* 105, 69–84.
- Leonard, A. S. O., Lim, I. N. A., Hemsworth, D. A. E., Horne, M. C., & Johannes, W. H. (1999). Calcium calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3239–3244.
- Lerma, J., Paternain, A. V., Rodríguez-Moreno, A., & López-García, J. C. (2017). Molecular Physiology of Kainate Receptors. *Physiological Reviews* 81, 971–998.
- Levy, W. B., & Steward, O. (1983). Temporal contiguity requirements for long-term associative potentiation/depression in the hippocampus. *Neuroscience* 8, 791-797.
- Lisman, J., Schulman, H., & Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 175–190.
- Lynch, G. S., Dunwiddie, T., & Gribkoff, V. (1977). Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266, 730–732.
- Malenka, R. C., Madison, D. V., & Nicoll, R. A. (1986). Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 321, 175–177.

- Malinow, R., & Tsien, R. W. (1990). Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346, 177–180.
- Mameli, M., Carta, M., Partridge, D., & Valenzuela, F. (2005). Neurosteroid-Induced Plasticity of Immature Synapses via Retrograde Modulation of Presynaptic NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience* 25, 2285–2294.
- Mariotti, L., Losi, G., Lia, A., Melone, M., Chiavegato, A., Gómez-gonzalo, M., ... Carmignoto, G. (2018). Interneuron-specific signaling evokes distinctive somatostatin-mediated responses in adult cortical astrocytes. *Nature Communications* 9: 82.
- Mariotti, L., Losi, G., Sessolo, M., Marcon, I., & Carmignoto, G. (2015). The Inhibitory Neurotransmitter GABA Evokes Long-Lasting Ca²⁺ Oscillations in Cortical Astrocytes. *Glia* 64, 363–373.
- Markram, H., Gerstner, W., & Sjöström, P. J. (2012). Spike-Timing-Dependent Plasticity: A Comprehensive Overview. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 4:2.
- Markram, H., Helm, P. J., & Sakmann, B. (1995). Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *The Journal of Physiology* 485, 1–20.
- Markram, Henry, Lu, J., & Frotscher, M. (1997). Regulation of Synaptic Efficacy by Coincidence of Postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275, 213–215.
- Martín, R., Bajo-Grañeras, R., Moratalla, R., Perea, G., & Araque, A. (2015). Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science* 349, 730–735.
- Matta, J. A., Ashby, M. C., Sanz-Clemente, A., Roche, K. W., & Isaac, J. T. R. (2011). MGluR5 and NMDA Receptors Drive the Experience- and Activity-Dependent NMDA Receptor NR2B to NR2A Subunit Switch. *Neuron* 70, 339–351.
- McGuinness, L., Taylor, C., Taylor, R. D. T., Yau, C., Langenhan, T., Hart, M. L., ... Emptage, N. J. (2010). Presynaptic NMDARs in the Hippocampus Facilitate Transmitter Release at Theta Frequency. *Neuron* 68, 1109–1127.
- Meador-Woodruff, J. H., & Healy, D. J. (2000). Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Research Reviews* 31, 288–294.
- Mederos, S., Covelo, A., Perea, G., Go, R., Quintana, R., Rayan, A., ... Araque, A. (2016). Activity-dependent switch of GABAergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *eLife* 5:e20362.
- Meier, S. D., Kafitz, K. W., & Rose, C. R. (2008). Developmental Profile and Mechanisms of GABA-Induced Calcium Signaling in Hippocampal Astrocytes. *Glia* 56, 1127–1137.
- Mel, B. W., Schiller, J., & Poirazi, P. (2017). Synaptic plasticity in dendrites: complications and coping strategies. *Current Opinion in Neurobiology* 43, 177–186.
- Min, R., & Nevian, T. (2011). Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nature Neuroscience* 15, 746–753.

- Mony, L., Kew, J. N. C., Gunthorpe, M. J., & Paoletti, P. (2009). Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *British Journal of Pharmacology* 157, 1301–1317.
- Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S., & Paoletti, P. (2011). Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO Journal* 30, 3134–3146.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540.
- Morishita, W., Lu, W., Smith, G. B., Nicoll, R. A., Bear, M. F., & Malenka, R. C. (2007). Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Neuropharmacology* 52, 71–76.
- Morley, R. M., Tse, H. W., Feng, B., Miller, J. C., Monaghan, D. T., & Jane, D. E. (2005). Synthesis and pharmacology of N1-substituted piperazine-2,3-dicarboxylic acid derivatives acting as NMDA receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 2627–2637.
- Mulkey, R. M., & Malenka, R. C. (1992). Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9, 967–975.
- Nabavi, S., Kessels, H. W., Alfonso, S., Aow, J., Fox, R., & Malinow, R. (2013). Metabotropic NMDA receptor function is required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 4027–4032.
- Nabavi, Sadegh, Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTP and LTP. *Nature* 511, 348–352.
- Navarrete, M., & Araque, A. (2008). Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. *Neuron* 57, 883–893.
- Nozaki, C., Vergnano, A. M., Filliol, D., Ouagazzal, A. M., Le Goff, A., Carvalho, S., ... Kieffer, B. L. (2011). Zinc alleviates pain through high-affinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nature Neuroscience* 14, 1017–1022.
- Orkand, R. K., Nicholls, J. G., & Kuffler, S. W. (1996). Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *Journal of Neurophysiology* 29, 788–806.
- Oswald, A.-M. M., & Reyes, A. D. (2008). Maturation of Intrinsic and Synaptic Properties of Layer 2/3 Pyramidal Neurons in Mouse Auditory Cortex. *Journal of Neurophysiology* 99, 2998–3008.
- Pachernegg, S., Strutz-Seeböhm, N., & Hollmann, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: Not just one-trick ponies. *Trends in Neurosciences* 35, 240–249.
- Padamsey, Z., Tong, R., & Emptage, N. (2017). Glutamate is required for depression but not potentiation of long-term presynaptic function. *eLife*, 6: e29688.

- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383–
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., ... Oliet, S. H. R. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150, 633–646.
- Paschen, W., Widmann, R., & Weber, C. (1992). Changes in regional polyamine profiles in rat brains after transient cerebral ischemia (single versus repetitive ischemia): Evidence for release of polyamines from injured neurons. *Neuroscience Letters* 135, 121–124.
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J. Y., ... Haydon, P. G. (2005). Neurobiology: Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310, 113–116.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (1997). Intracellular Calcium Oscillations in Astrocytes: A Highly Plastic, Astrocytes In Situ. *The Journal of Neuroscience* 17, 7817–7830.
- Perea, G., & Araque, A. (2005). Glial calcium signaling and neuron – glia communication. *Cell-Calcium* 38, 375–382.
- Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes Potentiate Transmitter Release at Single Hippocampal Synapses. *Science* 317, 1083-1086.
- Perez-Otaño, I., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). Presynaptic NMDARs and astrocytes ally to control circuit-specific information flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116,13166-13168.
- Pérez-Rodríguez, M., Arroyo-García, L. E., Prius-Mengual, J., Andrade-Talavera, Y., Armengol, J. A., Pérez-Villegas, E. M., ... Rodríguez-Moreno, A. (2019). Adenosine Receptor-Mediated Developmental Loss of Spike Timing-Dependent Depression in the Hippocampus. *Cerebral Cortex* 29, 3266-3281.
- Philip Y. Wang, Ronald S. Petralia, Ya-Xian Wang, Robert J. Wenthold, and S. D. B. (2011). Functional NMDA Receptors at Axonal Growth Cones of Young Hippocampal Neurons. *J Neurosci*, 34, 9289–9297.
- Pin, J. P., & Duvoisin, R. (1995). Review: Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1–26.
- Pina-Crespo, J. C., Talantova, M., Micu, I., States, B., Chen, H.-S. V., Tu, S., ... Lipton, S. A. (2010). Excitatory Glycine Responses of CNS Myelin Mediated by NR1/NR3 “NMDA” Receptor Subunits. *Journal of Neuroscience* 30, 11501–11505.
- Pittaluga, A., & Raiteri, M. (1990). Release-enhancing glycine-dependent presynaptic NMDA receptors exist on noradrenergic terminals of hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 191, 231–234.
- Porter, J. T., & McCarthy, K. D. (1996). Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals. *Journal of Neuroscience* 16, 5073–5081.

- Qin, Y., Zhu, Y., Baumgart, J. P., Stornetta, R. L., Seidenman, K., Mack, V., ... Zhu, J. J. (2005). State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes and Development* 19, 2000–2015.
- Rachline, J. (2005). The Micromolar Zinc-Binding Domain on the NMDA Receptor Subunit NR2B. *Journal of Neuroscience* 25, 308–317.
- Reeve, J. E., Kohl, M. M., Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O., & Anderson, H. L. (2012). for the study of subcellular ion channel function. *Communicative & Integrative Biology* 5, 240–242.
- Rodríguez-Moreno, A., Banerjee, A., & Paulsen, O. (2010). Presynaptic NMDA receptors and spike timing-dependent depression at cortical synapses. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 2: 18.
- Rodríguez-Moreno, A., Kohl, M. M., Reeve, J. E., & Eaton, T. R., Collins H. A., Anderson H. L. & Paulsen O. (2011). Preynaptic induction and expression of t-LTD demonstrated by compartment-specific and expression of t-LTD demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *Journal of Neuroscience* 31, 8564–8569.
- Rodríguez-Moreno, A., & Paulsen, O. (2008). Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nature Neuroscience* 11, 744–745.
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2013). Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca^{2+} – calmodulin and PKA in cerebrocortical synaptosomes. *FEBS Letters* 587, 788–792.
- Rodríguez-Moreno, A., González-Rueda, A., Abhishek, B., Louise Upton, A., Craig, M. T., & Paulsen, O. (2013). Presynaptic Self-Depression at Developing Neocortical Synapses. *Neuron* 77, 35–42.
- Rumbaugh, G., Prybylowski, K., Wang, J. F., & Vicini, S. (2000). Exon 5 and spermine regulate deactivation of NMDA receptor subtypes. *Journal of Neurophysiology* 83, 1300–1306.
- Rumpel, S., Kattenstroth, G., & Gottmann, K. (2004). Silent Synapses in the Immature Visual Cortex: Layer-Specific Developmental Regulation. *Journal of Neurophysiology* 91, 1097–1101.
- Rusakov, D. A., Bard, L., Stewart, M. G., & Henneberger, C. (2014). Diversity of astroglial functions alludes to subcellular specialisation. *Trends in Neurosciences* 37, 228–242.
- Santello, M., Bezzi, P., & Volterra, A. (2011). TNF α Controls Glutamatergic Gliotransmission in the Hippocampal Dentate Gyrus. *Neuron* 69, 988–1001.
- Schafe, G. E., Bauer, E. P., Rosis, S., Farb, C. R., Rodrigues, S. M., & Ledoux, J. E. (2005). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *European Journal of Neuroscience* 22, 201–211.
- Scheiderer, C. L., Dobrunz, L. E., & McMahon, L. L. (2004). Novel Form of Long-Term Synaptic Depression in Rat Hippocampus Induced By Activation of $\alpha 1$ Adrenergic Receptors. *Journal of Neurophysiology* 91, 1071–1077.

- Schipke, C. G., Heuser, I., & Peters, O. (2011). Antidepressants act on glial cells: SSRIs and serotonin elicit astrocyte calcium signaling in the mouse prefrontal cortex. *Journal of Psychiatric Research* 45, 242–248.
- Schuman, Erbin M., & Madison, D. V. (1991). A Requirement for the Intercellular Messenger Nitric Oxide in Long-Term Potentiation. *Science* 254, 1503-1506.
- Schuman, Erin M., & Madison, D. V. (1994). Nitric Oxide and synaptic function. *Annual Reviews of Neuroscience* 17, 153-158.
- Schwartz, E. J., Rothman, J. S., Dugue, G. P., Diana, M., Rousseau, C., Silver, R. A., & Dieudonne, S. (2012). NMDA Receptors with Incomplete Mg²⁺ Block Enable Low-Frequency Transmission through the Cerebellar Cortex. *Journal of Neuroscience* 32, 6878–6893.
- Schwarz, Y., Zhao, N., Kirchhoff, F., & Bruns, D. (2017). Astrocytes control synaptic strength by two distinct v-SNARE-dependent release pathways. *Nature Neuroscience* 20, 1529–1539.
- Seifert, G., & Steinhäuser, C. (2001). Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. *Progress in Brain Research* 132, 287–299.
- Selig, D. K., Hjelmstad, G. O., Herron, C., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1995). Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses. *Neuron* 15, 417–426.
- Sheng, M., Cummings J., Roldan L. A... (1994). Changing subunit composition of NMDA receptors. *Nature* 368, 144-147.
- Shigetomi, E., Patel, S., & Khakh, B. S. (2016). Probing the complexities of astrocyte calcium signaling. *Trends in Cell Biology* 46, 1247–1262.
- Shinohara, Y., Hirase, H., Watanabe, M., Itakura, M., Takahashi, M., & Shigemoto, R. (2008). Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 19498–19503.
- Siegel, S. J., Brose, N., Janssen, W. G., Gasic, G. P., Jahn, R., Heinemann, S. F., & Morrison, J. H. (2006). Regional, cellular, and ultrastructural distribution of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in monkey hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 564–568.
- Sjöström, J., Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2003). Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and Cannabinoid Receptors. *Neuron* 39, 641-654.
- Sjöström, P., Jesper, Rancz, E. A., Roth, A., & Häusser, M. (2008). Dendritic Excitability and Synaptic Plasticity. *Physiological Reviews* 88, 769–840.
- Sjöström, Per Jesper, Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2001). Rate, Timing and Cooperativity Jointly Determine Cortical Synaptic Plasticity. *Neuron* 32, 1149–1164.
- Sontheimer, H. (1994). Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* 11, 156–172.
- Sorra, K., & Harris, K. (2018). Occurrence and three-dimensional structure of multiple synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1. *The Journal of Neuroscience* 38, 3736–3748

- Stanton, P. K., Winterer, J., Bailey, C. P., Kyrozi, A., Raginov, I., Laube, G., ... Müller, W. (2003). Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. *The Journal of Neuroscience* 23, 5936–5944.
- Stiene-Martin, A., Zhou, R., & Hauser, K. F. (1998). Regional, developmental, and cell cycle-dependent differences in μ , δ , and κ -opioid receptor expression among cultured mouse astrocytes. *Glia* 22, 249–259.
- Stroebel, D., Carvalho, S., Grand, T., Zhu, S., & Paoletti, P. (2014). Controlling NMDA Receptor Subunit Composition Using Ectopic Retention Signals. *Journal of Neuroscience* 34, 16630–16636.
- Stuart, G. j., & Sakmann, B. (1994). Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367, 69-72.
- Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K., & Hirase, H. (2011). Astrocyte Calcium Signaling Transforms Cholinergic Modulation to Cortical Plasticity In Vivo. *Journal of Neuroscience* 31, 18155–18165.
- Tanaka, C., & Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annual Review of Neuroscience* 17, 551-567.
- Thiagarajan, T. C., Lindskog, M., & Tsien, R. W. (2005). Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron* 47, 725–737.
- Toyoda, H., Zhao, M. G., & Zhuo, M. (2005). Roles of NMDA receptor NR2A and NR2B subtypes for long-term depression in the anterior cingulate cortex. *European Journal of Neuroscience* 22, 485–494.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews* 62, 405-496.
- Turrigiano, G. G. (2008). The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. *Cell* 135, 422–435.
- Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C., & Nelson B., S. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391, 892-896.
- Vance, K. M., Hansen, K. B., & Traynelis, S. F. (2012). GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *Journal of Physiology* 590, 3857–3875.
- Vergnano, A. M., Rebola, N., Savtchenko, L. P., Pinheiro, P. S., Casado, M., Kieffer, B. L., ... Paoletti, P. (2014). Zinc dynamics and action at excitatory synapses. *Neuron* 82, 1101–1114.
- Verkhratsky, A., & Steinhäuser, C. (2000). Ion channels in glial cells. *Brain Research Reviews* 32, 380–412.
- Vicini, S., Wang, J. F., Li, J. H., Zhu, W. J., Wang, Y. H., Luo, J. H., ... Grayson, D. R. (1998). Functional and Pharmacological Differences Between Recombinant N -Methyl- d -Aspartate Receptors. *Journal of Neurophysiology* 79, 555–566.

- Wang, J. K. T., Andrews, H., & Thukral, V. (1992). Presynaptic Glutamate Receptors Regulate Noradrenaline Release from Isolated Nerve Terminals. *Journal of Neurochemistry* 58, 204–211.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G., Peng, W. G., Han, X., ... Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nature Neuroscience* 9, 816–823.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., & Mishina, M. (1992). Developmental changes in distribution of nmda receptor channel subunit m rim as. *NeuroReport* 3, 1138–1140.
- Weitlauf, C. (2005). Activation of NR2A-Containing NMDA Receptors Is Not Obligatory for NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience* 25, 8386–8390.
- Wiens, K. M. (2005). Rac1 Induces the Clustering of AMPA Receptors during Spinogenesis. *Journal of Neuroscience* 25, 10627–10636.
- Wierenga, C. J., Walsh, M. F., & Turrigiano, G. G. (2006). Temporal Regulation of the Expression Locus of Homeostatic Plasticity. *Journal of Neurophysiology* 96, 2127–2133.
- Woodhall, G., Evans, D. I., Cunningham, M. O., & Jones, R. S. G. (2001). NR2B-Containing NMDA Autoreceptors at Synapses on Entorhinal Cortical Neurons. *Journal of Neurophysiology* 86, 1644–1651.
- Xie, Z., Srivastava, D. P., Photowala, H., Kai, L., Cahill, M. E., Woolfrey, K. M., ... Penzes, P. (2007). Kalirin-7 Controls Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron* 56, 640–656.
- Yasuda, H., Barth, A. L., Stellwagen, D., & Malenka, R. C. (2003). A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nature Neuroscience* 6, 15–16.
- Zhang, J., & Diamond, J. S. (2009). Subunit- and Pathway-Specific Localization of NMDA Receptors and Scaffolding Proteins at Ganglion Cell Synapses in Rat Retina. *Journal of Neuroscience* 29, 4274–4286.
- Zhang, Q., Pangršič, T., Kreft, M., Kržan, M., Li, N., Sul, J. Y., ... Haydon, P. G. (2004). Fusion-related Release of Glutamate from Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279, 12724–12733.
- Zhang, X. -l., Zhou, Z. -y., Winterer, J., Muller, W., & Stanton, P. K. (2006). NMDA-Dependent, But Not Group I Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent, Long-Term Depression at Schaffer Collateral-CA1 Synapses Is Associated with Long-Term Reduction of Release from the Rapidly Recycling Presynaptic Vesicle Pool. *Journal of Neuroscience* 26, 10270–10280.
- Zhao, Y., & Tzounopoulos, T. (2011). Physiological Activation of Cholinergic Inputs Controls Associative Synaptic Plasticity via Modulation of Endocannabinoid Signaling. *Journal of Neuroscience* 31, 3158–3168.
- Zhu, J. J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., & Malinow, R. (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110, 443–455.

Zucker R., W. G. R. (2002). Short-term synaptic plasticity. Scholarpedia, Annual Review of Physiology. Annual Review of Physiology 64, 355-405.

Zukin, R. S., & Bennett, M. V. L. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDARI receptor subunit. Trends in Neurosciences 18, 306–313.